

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Reduktion des portalen Drucks in der zirrhotischen Rattenleber:  
Bedeutung des Cannabinoid-Rezeptor 2 – Hämoxygenase 1  
Signalwegs**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

**vorgelegt von  
Leonore Friederike Gmelin  
aus Eutin  
2014**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sabine Steffens  
Prof. Dr. Max Schnurr

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christian J. Steib

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.10.2014

*meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Seite

## 1. Einleitung 1-30

1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Leberzirrhose.....	1
1.2 Komplikation der Leberzirrhose.....	2
1.3 Die portale Hypertension und ihrer klinische Bedeutung.....	3
1.3.1 Aktuelle Konzepte zur Prävention und Therapie von Varizen.....	4
1.3.2 Aktuelle Konzepte zur Prävention und Therapie von Aszites.....	8
1.4 Pathogenese der portalen Hypertension.....	13
1.4.1 allgemeine Mechanismen zur Entstehung der portalen Hypertension...	13
1.4.2 Störungen der Mikrozirkulation.....	14
1.4.2.1 beteiligte Zellen.....	15
1.4.2.2 Vasokonstriktoren.....	17
1.4.3 Veränderungen im systemischen Kreislauf.....	19
1.5 Kupfferzellen und deren Einfluss auf die portale Hypertension.....	21
1.6 Einfluss von Cannabinoiden und deren Agonisten auf Leberzirrhose und die portale Hypertension.....	24
1.7 Wirkungen von Hämoxygenasen in der zirrhotischen Leber.....	28

## 2. Fragestellung 31

2.1 Können Cannabinoid-Rezeptor 2 Agonisten den portalen Druck <i>in vivo</i> am Modell der zirrhotischen Rattenleber senken?.....	31
2.2 Existiert in der zirrhotischen Rattenleber der Cannabinoid-Rezeptor 2/ Hämoxygenase-Signalweg?.....	31
2.3 Besitzt der Cannabinoid-Rezeptor 2/Hämoxygenase-Signalweg eine funktionelle Rolle in der zirrhotischen Rattenleber?.....	31
2.4 Welche Rolle spielt der Cannabinoid-Rezeptor 2 Agonist JWH-133 in der isolierten Kupfferzelle für die Produktion des Vasokonstriktors ThromboxanA <sub>2</sub> ?.....	31



	Seite
<b>3. Methoden</b>	<b>32-49</b>
3.1 Tierversuche.....	32
3.2 Induktion der Leberfibrose an zwei Tiermodellen – Gallengangsligatur (BDL = bile duct ligation) und Thioacetamid-Behandlung (TAA).....	32
3.2.1 Bile duct ligation = Gallengangsligatur.....	32
3.2.2 Thioacetamid Behandlung.....	34
3.2.3 Histologie der Leberzirrhose.....	34
3.3 <i>in vivo</i> Versuche an der SD-Ratte aus dem Modell BDL und TAA.....	35
3.3.1 mit Lipopolysaccharid.....	36
3.3.2 mit Lipopolysaccharid und Vorbehandlung mit JWH-133.....	38
3.4 isolierte Leberperfusion an der SD- Ratte aus der Gruppe BDL.....	41
3.4.1 Aktivierung der Kupfferzellen mittels Zymosan in der isolierten Leberperfusion.....	41
3.4.2 isolierte Leberperfusion mittels Zymosan und Vorbehandlung mit JWH- 133 .....	41
3.4.3 isolierte Leberperfusion mit Zymosan und Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX.....	42
3.5 Western Blot Analyse zur Darstellung der Proteinexpression des CB <sub>2</sub> - Rezeptors und der HO-1 Expression nach Stimulation mit JWH-133 aus den Leberlysaten der isolierten Perfusion am Modell BDL.....	43
3.6 Messung der Thromboxan B <sub>2</sub> -Produktion mittels ELISA nach Stimulation mit Zymosan und Zymosan/ZnPP IX im effluenten Perfusat der Gruppe BDL....	44
3.7 Kupfferzellisolation aus gesunden Rattenlebern.....	44
3.8 Konfokale Mikroskopie zur Bestimmung der CB <sub>2</sub> -Rezeptordichte und der HO-1 Expression in der isolierten Kupfferzellen.....	47
3.9 Western Blot Analyse der HO-1 Expression isolierter Kupfferzellen gesunder SD-Ratten vor und nach Stimulation mit JWH-133.....	48
 <b>4. Materialien</b>	 <b>50-53</b>
4.1 Chemikalien, Medikamente, Reagenzien.....	50

	Seite
4.2 Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten.....	51
4.3 Materialien für den Western Blot.....	51
4.4 Materialien für den ELISA.....	52
4.5 Materialien für die Kupferzellisolation.....	52
4.6 Materialien für die konfokale Mikroskopie.....	53
 <b>5. Ergebnisse</b>	 <b>54-78</b>
5.1 Charakterisierung der Leberhistologie: Zirrhosemodelle.....	54
5.1.1 cholestatische Leberzirrhose BDL Modell.....	55
5.1.2 toxische induzierte Leberzirrhose TAA Modell.....	56
5.2 Portale Druckänderung im <i>in vivo</i> Versuch mit Vorbehandlung von CB <sub>2</sub> -Rezeptor Agonisten (JWH-133) und anschließender LPS Stimulation am Modell BDL und TAA.....	57
5.2.1 basaler und maximaler portaler Druck im Vergleich mit und ohne JWH-133 Vorbehandlung am Modell BDL.....	57
5.2.2 basaler und maximaler portaler Druck im Vergleich mit und ohne JWH-133 Vorbehandlung am Modell TAA.....	59
5.3 Auswirkungen der JWH-133 Vorbehandlung auf den systemischen Druck...61	
5.4 Darstellung der Hämoxygenase-1 und des CB <sub>2</sub> -Rezeptors nach Stimulation mit dem CB <sub>2</sub> -Rezeptor Agonisten (JWH-133) im Western Blot.....	63
5.5 Effekte der JWH-133 Vorbehandlung mit Zymosan-Stimulation an der isolierten Leberperfusion am Modell BDL.....	65
5.6 Auswirkungen auf den portalen Perfusionsdruck durch die Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX am Modell BDL.....	67
5.6.1 Einfluss der ZnPP IX Gabe auf den basalen, maximalen und den Druck am Ende der Perfusion.....	67
5.6.2 Absoluter Druckanstieg im Vergleich alleinige Zymosan-Gabe versus ZnPP IX Vorbehandlung mit anschließender Zymosan-Stimulation.....	69
5.7 Messung der Thromboxan B <sub>2</sub> -Bildung im Perfusat nach Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX.....	70
5.8 konfokale Mikroskopie: Darstellung der CB <sub>2</sub> -Rezeptoren vor und nach	

Behandlung mit JWH-133.....	72
5.9 konfokale Mikroskopie: Darstellung der HO-1 vor und nach Behandlung mit JWH-133.....	74
5.10 Proteinexpression der HO-1 vor und nach Behandlung mit JWH-133 an der isolierten Kupfferzelle.....	76
5.11 Ermittlung der Thromboxan B <sub>2</sub> -Bildung an der isolierten Kupfferzelle nach Stimulation mit JWH-133 und Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX.....	77
 <b>6. Diskussion</b>	 79-93
6.1 Wirkung von CB <sub>2</sub> -Rezeptor Agonisten auf den portalen Druck bei Leberzirrhose am Rattenmodell.....	81
6.2 Reaktion der Kupfferzellen nach Stimulation mit JWH-133.....	84
6.3 Zusammenhang zwischen CB <sub>2</sub> -Agonisten und der HO-1 an der isolierten Kupfferzelle.....	86
6.4 Einfluss der HO-1 auf die portale Hypertension und auf die isolierte Kupfferzelle.....	89
6.5 CB <sub>2</sub> -Agonisten als potentielle Therapieoption bei Leberzirrhose und portaler Hypertension.....	91
 <b>7. Zusammenfassung</b> .....	 94
 <b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	 96
 <b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	 99
 <b>10. Publierte Ergebnisse</b> .....	 117
 <b>11. Danksagung</b> .....	 118

## 1. Einleitung

### 1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie der Leberzirrhose

Als Spätfolge vieler Lebererkrankungen hat die Leberzirrhose eine zentrale Bedeutung (Wiegand and Berg 2013). Sie wird definiert durch die Aufhebung ihrer spezifischen Läppchen- und Gefäßstrukturen wie den Zentralvenen, Glisson'schen Triaden, sowie der Portalfelder. Über eine entzündlich gesteuerte Fibrosierung bilden sich zunächst zwischen den Portalfeldern Bindegewebssepten und im weiteren Verlauf Regeneratknoten. Durch die Fibrosierung der Leber kommt es zu einer progredienten Verlegung der Lebergefäße sowie der Lebersinusoide. Eine Folge ist die portale Hypertension und die Ausbildung von Kollateralgefäßen im Sinne von intrahepatischen porto-systemischen Shunts. Über mehrere Jahre verschlechtert sich die Leberfunktion progredient und kann zu einem Leberversagen führen.

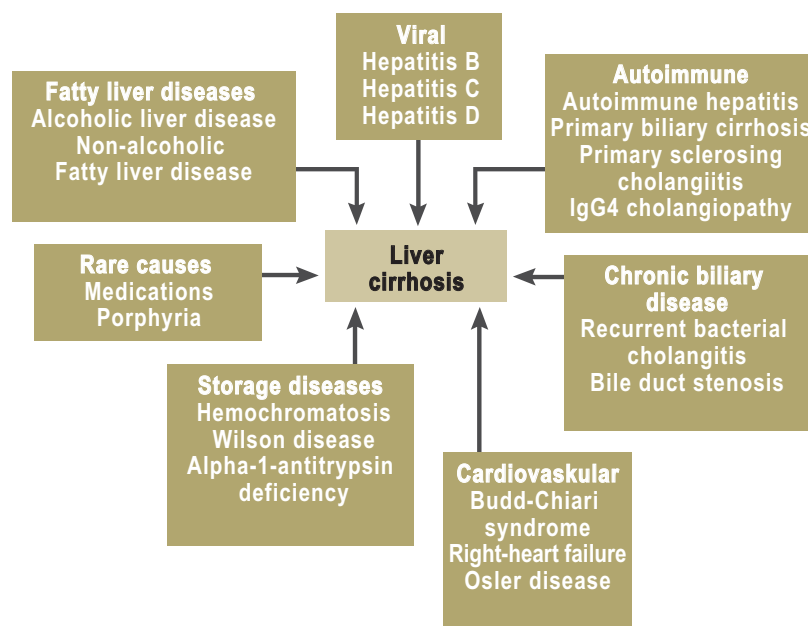


Abb.1) Ätiologien der Leberzirrhose nach Wiegand J. et al. 2013 (Wiegand and Berg 2013).

Die Leberzirrhose ist weltweit verbreitet und betrifft alle Rassen gleichwertig. Allein in Europa und USA beträgt die Inzidenz 250/100.000 Menschen pro Jahr (Bahr and Manns 1999). Im Jahr 2000 war in den USA die Leberzirrhose auf Platz 12 der

Todesursachenstatistik und war demnach für mehr als 25.000 Todesfälle verantwortlich (Gines, Cardenas et al. 2004).

Für die Entstehung der Leberzirrhose in den Industrienationen spielen zwei Ursachen eine besondere Rolle 1.) chronischer Alkoholabusus und 2.) chronische Virushepatitiden vor allem der Gruppe B und C (Bahr and Manns 1999).

Über 50% aller diagnostizierten Leberzirrhosen entstehen durch die chronische Leberschädigung auf Grund von übermäßigem Alkoholkonsum (Gesundheitsbericht für Deutschland (1998)).

Die chronischen Virushepatitiden der Gruppe B und C sind nicht nur in den Industrienationen (40-50%) für die Entstehung einer Zirrhose verantwortlich (Bahr and Manns 1999). Derzeit sind 2-3% der Weltbevölkerung mit dem Hepatitis C Virus infiziert (Wasley and Alter 2000; Lavanchy 2009; Mohd Hanafiah, Groeger et al. 2013).

Weltweit ist die chronische HCV Infektion hauptsächlich für die Entstehung einer chronischen Lebererkrankung verantwortlich (Thein, Yi et al. 2008; Rosen 2011). In den USA ist die HCV induzierte Leberzirrhose eine der Hauptindikationen für eine Lebertransplantation (Verna and Brown 2006). 30% der chronischen Hepatitis C Infektionen gehen in die Leberzirrhose über (Heintges et al. 1997).

In den westlichen Industrienationen zeichnete sich in den letzten Jahren eine steigende Prävalenz der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) ab (Younossi et al. 2011). In 10% der Fälle geht die NAFLD in eine Leberzirrhose über (Heidelbaugh et al. 2006).

Weitere circa 5% der Leberzirrhosen entstehen auf dem Boden anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC), Primäre Biliäre Cholangitis (PBC) sowie Autoimmunhepatitiden (Wiegand and Berg 2013).

## **1.2 Komplikation der Leberzirrhose**

Entscheidender Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf einer Leberzirrhose ist das Auftreten ihrer Komplikationen. Hierzu gehören vor allem die Leberinsuffizienz, Infektionen und das hepatozelluläre Karzinom (HCC). Von besonderer klinischer Bedeutung sind jedoch die Veränderungen bedingt durch die portale Hypertension. Die häufigsten Komplikationen sind die Bildung von Aszites, das hepatorenale

Syndrom (HRS), die hepatische Enzephalopathie (HE) und die Ausbildung von Varizen im Bereich des Ösophagus und des Magens. Viele dieser Komplikationen sind wiederum Risikofaktoren für weitere Erkrankungen. So wird zum Beispiel durch das Auftreten von Aszites die Wahrscheinlichkeit einer Spontan Bakteriellen Peritonitis (SBP) erhöht und durch das Auftreten von Varizen steigt das Risiko einer Varizenruptur um ein Vielfaches. Aufgrund der hohen Inzidenz von Aszites und Varizen bei Patienten mit Leberzirrhose soll hier im weiteren näher auf aktuelle Konzepte zur Therapie und Prävention eingegangen werden (siehe 1.3.1 und 1.3.2 ).

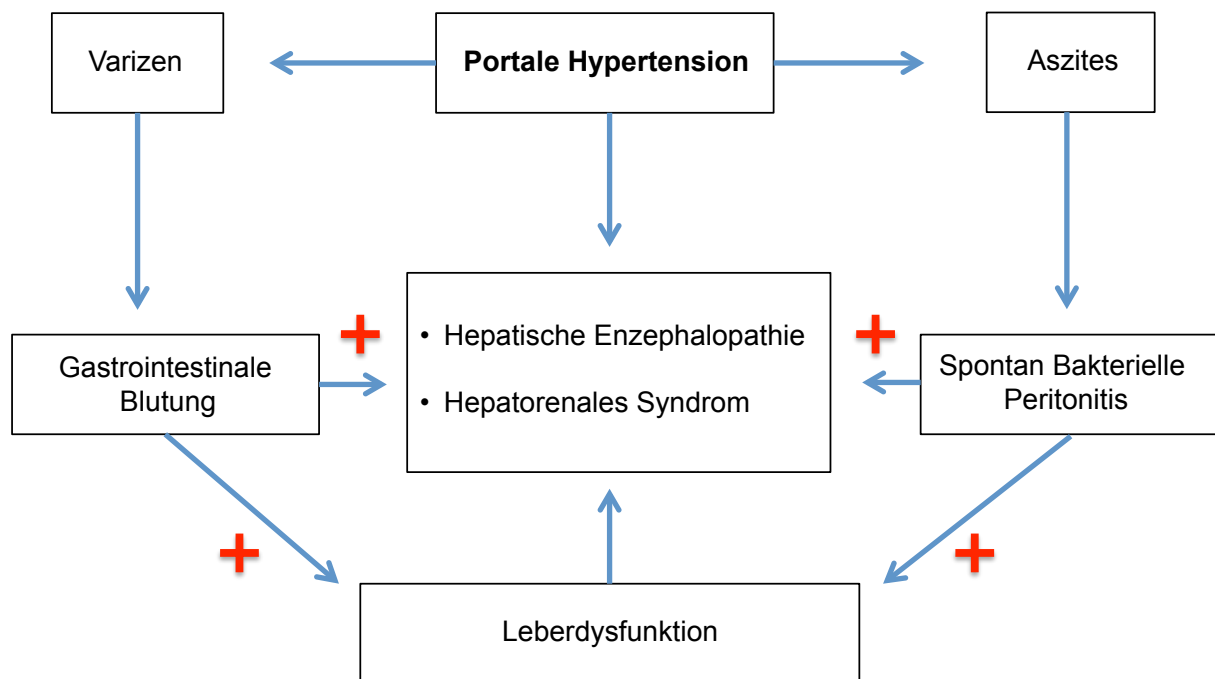


Abb.2) Komplikationen der Leberzirrhose und der portalen Hypertension sowie ihre Risikofaktoren für weitere Zirrhose-assoziierte Lebererkrankungen (modifiziert nach Steib C.J. Dissertation 2004).

### 1.3 Die portale Hypertension und ihre klinische Bedeutung

Die Portale Hypertension ist die wichtigste Komplikation der Leberzirrhose. Sie ist gleichzeitig Ursache für die Bildung von Varizen und deren Blutung, sowie für die Entstehung von Aszites (Garcia-Tsao 2001).

Definiert wird die portale Hypertension über einen erhöhten Gradienten zwischen dem portalvenösen und dem zentralvenösen Druck, bezeichnet als HVP (Hepatic Venous Pressure Gradient). Ab einer Druckdifferenz größer 5 mmHg spricht man von

einer portalen Hypertension, ab einem Wert  $>10$  mmHg wird die portale Hypertension klinisch signifikant (Wright and Ridders 2005).

Der progressiv erhöhte intrahepatischen Gefäßwiderstand kann letztlich zu einer Flußumkehrung im portalvenösen Stromgebiet (hepatofugal) führen. Es bilden sich Kollateralkreisläufe in mehreren Gefäßstraßen. Klinisch mit bloßem Auge zu erkennen ist das Caput medusae, welches eine Rekanalisierung und Dilatation der Vv. paraumbilicales darstellt. Es bildet sich eine portokavale Anastomose zwischen Pfortader und Vena cava inferior aus.

Eine besondere klinische Bedeutung haben die gastroösophagealen Varizen. Die Ruptur und anschließende Blutung aus diesen Varizen ist die Haupttodesursache bei Patienten mit Leberzirrhose. Bei ca. 50% aller Patienten mit Leberzirrhose können Varizen am Magen und Ösophagus nachgewiesen werden (Garcia-Tsao and Bosch 2010).

Des Weiteren ist eine der häufigsten Komplikationen der Leberzirrhose die Ausbildung von Aszites. Aufgrund einer Dysbalance zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren kommt es zu einem vermehrten Pooling venösen Blutes im Splanchnikusgebiet (siehe 1.4.3). Durch den hohen intravasalen Druck und das erhöhte Blutvolumen im prähepatischen Gefäßbett wird freie Flüssigkeit in den freien Bauchraum abgepresst. Innerhalb von 10 Jahren nach Erstdiagnose kann bei 58% der Patienten mit kompensierter Leberzirrhose Aszites nachgewiesen werden, ohne dass andere Komplikationen der Leberzirrhose vorhanden sind (Gines, Quintero et al. 1987).

Varizen und Aszites haben eine besondere klinische Bedeutung, da durch ihre Komplikationen die Morbidität und Mortalität der Patienten mit Leberzirrhose maßgeblich beeinflusst wird. Es bedarf daher intensiven präventiven Maßnahmen und bei bereits aufgetretenen Komplikationen ein regelmäßiges Monitoring und einer konservativen oder später interventionellen Therapie.

### **1.3.1 Aktuelle Konzepte zur Prävention und Therapie von Varizen**

Ab einem HVPg von über 10 mmHg treten Varizen aus den Kollateralgefäßen hervor (Wright and Ridders 2005; Bari and Garcia-Tsao 2012). Des Weiteren korreliert ihr Auftreten mit dem Schweregrad der Leberzirrhose, welche anhand der Child-

Turcotte-Pugh Einteilung klassifiziert wird. Bei über 85% der Patienten mit einer Leberzirrhose Child-Turcotte-Pugh Grad C können gastroösophageale Varizen diagnostiziert werden (Garcia-Tsao, Sanyal et al. 2007).

Die jährliche Inzidenz einer Varizenblutung bei Patienten mit Leberzirrhose beträgt 5-15%. Stärkster Prädiktor einer Varizenruptur stellt einen HVPG von über 10mmHg dar (Garcia-Tsao and Bosch 2010). Außerdem korreliert das Risiko einer Varizenruptur mit der Größe der Varize, dem Stadium der Leberzirrhose, sowie dem endoskopischen Befund der „red wale marks“ der gastroösophagealen Varizen (Brocchi E 1988; Garcia-Tsao and Bosch 2010).

Jede Blutung aus einer Ösophagus- oder Fundusvarize geht mit einem Mortalitätsrisiko von 30% einher (Smith and Graham 1982; D'Amico, Garcia-Pagan et al. 2006). Das Rezidivrisiko einer gastroösophagealen Varizenblutung im ersten Jahr beträgt bis zu 70% nach der ersten stattgehabten Blutung (Graham and Smith 1981). Zur Minimierung des Risikos einer Rezidivblutung ist eine adäquate medikamentöse Rezidivprophylaxe von besonderem Stellenwert.

Unterschieden wird zwischen präventiven Maßnahmen und einer akuten Therapie bei einer Varizenblutung:

Im Sinne der Primärprävention gastroösophagealer Varizen ist die Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) bei Patienten mit der Erstdiagnose einer Leberzirrhose obligatorisch. Es kann somit das Risiko einer Varizenblutung eingeschätzt und verifiziert werden, ob eine medikamentöse Primärprävention erforderlich ist (de Franchis, Baveno et al. 2010).

Bei Patienten ohne Varizen bei Erstdiagnose einer Leberzirrhose gilt es die Bildung von Varizen zu verhindern. Der Fokus der Therapie (Prä-Primär Prophylaxe) sollte die Behandlung der Grunderkrankung sein. Es besteht keine Indikation für eine Therapie mit nicht selektiven Beta-Blockern (NSBB) (Groszmann, Garcia-Tsao et al. 2005; de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010).

Unter einer Primär-Prävention versteht man das Verhindern einer Erstblutung von Varizen bei Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertension. Es erfolgt eine Einteilung der Patienten nach dem Befund der ÖGD:

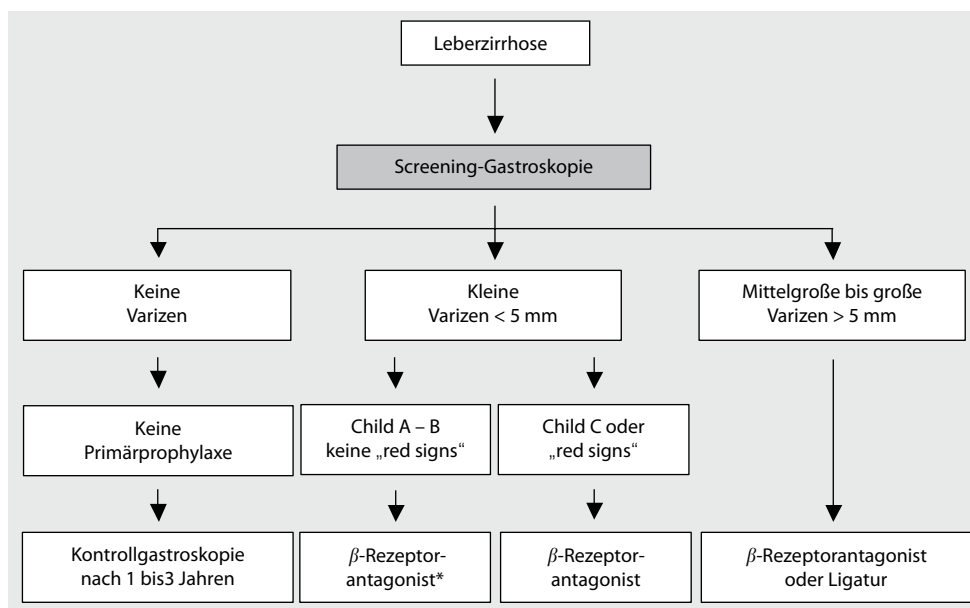
1.) Patienten mit kleinen Varizen (unter 5 mm im Durchmesser) (Wittenburg, Tennert et al. 2011): Hier besteht ein geringes Blutungsrisiko. Eine medikamentöse Therapie mit NSBB kann bei diesen Patienten erwogen werden (Merkel, Marin et al. 2004). Es besteht jedoch bislang kein hoher Evidenzgrad belegt durch Meta-Analysen, dass



NSBB in diesem Patientenkollektiv einen signifikanten Vorteil erzielen können (de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010).

2.) Patienten mit kleinen Varizen (unter 5 mm im Durchmesser) und zusätzlichen Risikofaktoren wie „red wale marks“ in der Endoskopie und/oder Leberzirrhose im Stadium Child B oder C haben ein höheres Risiko einer Varizenblutung. Studien konnten belegen, dass dieses Patientenkollektiv von einer medikamentösen Therapie mit nicht selektiven  $\beta$ -Rezeptorantagonisten (NSBB) profitiert (de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010).

3.) Bei Patienten mit großen Varizen (über 5 mm Durchmesser) besteht das größte Risiko einer Varizenblutung. Meta-Analysen aus randomisierten, kontrollierten Studien zeigten eine äquivalente Effektivität und keinen Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen endoskopisch gesteuerter Varizenligatur (EVL) und medikamentöser Therapie mit NSBB (Gluud, Klingenberg et al. 2007; de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010).



**Abb.3) Wittenburg et al. 2011 (Wittenburg, Tennert et al. 2011): Diagnostische und therapeutische Strategie zur Primärprophylaxe einer Ösophagusvarizenblutung.**  
*Erklärung siehe Text.*

Carvedilol, ein Beta-Blocker mit vasodilatierender Wirkung, scheint eine vielversprechende Alternative zu sein. In einer randomisierten, kontrollierten Studie konnte gezeigt werden, dass Carvedilol in geringer Konzentration (6,25 bis 12,5 mg/d) nur in 10% eine Varizenblutung auftrat verglichen zu EVL Patienten. Hier lag das Auftreten einer Varizenblutung bei 23% (Tripathi, Ferguson et al. 2009). Weitere

Studien müssen folgen, um die Effektivität von Carvedilol versus NSBB zu untersuchen (de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010).

Derzeit liegen keine suffizienten Daten vor, die eine Kombination mit Isosorbid-5-Mononitraten (ISMN) + NSBB oder Spironolacton + NSBB untersuchen. Es besteht daher keine Evidenz für eine Kombinationstherapie (de Franchis, Baveno et al. 2010).

Bisher wurde die Kombinationstherapie mit EVL + NSBB nur in geringem Umfang untersucht. In einer randomisierten Studie von 144 Patienten, die eine Kombinationstherapie aus EVL + NSBB versus Monotherapie mit EVL untersuchte, zeigte die Kombinationstherapie gegenüber der Monotherapie keinen Vorteil bezüglich der Inzidenz einer Varizenblutung sowie der Überlebenswahrscheinlichkeit (Sarin, Wadhawan et al. 2005; Kim and Park 2013). Auch hier bedarf es größerer Studien mit höherer Fallzahl um eine Empfehlung für oder wider eine Kombinationstherapie EVL + NSBB aussprechen zu können (de Franchis, Baveno et al. 2010).

Tritt das Szenario einer akuten Blutung ein, sollte umgehend mit einer vasoaktiven medikamentösen Therapie begonnen werden. In einer Meta-Analyse von der Arbeitsgruppe D'Amico et al. zeigte sich eine verbesserte Wirksamkeit der pharmakologischen Therapie in Bezug auf Hämostase, Anzahl der Transfusionen, Reblutung innerhalb der ersten 42 Tage und der Mortalität (D'Amico, Pagliaro et al. 2010). Derzeit wird für die Akuttherapie eine pharmakologische Behandlung, wie mit Terlipressin, Somatostatin-Analogen, wie Octreotid oder Vapreotid über 5 Tage empfohlen (Banares, Albillos et al. 2002; D'Amico, Pietrosi et al. 2003; Garcia-Tsao, Sanyal et al. 2007). Zusätzlich sollte innerhalb der ersten 12 Stunden nach Aufnahme des Patienten eine ÖGD durchgeführt werden (de Franchis, Baveno et al. 2010). Primär wird die Durchführung einer EVL empfohlen, jedoch kann bei technischen Schwierigkeiten auch eine Sklerosierungstherapie vorgenommen werden (de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Tsao and Bosch 2010). Des Weiteren sollte nach stationärer Aufnahme des Patienten eine prophylaktische Antibiotikatherapie mit oralen Quinolonen, wie Norfloxacin verabreicht werden. Bei Patienten mit weit fortgeschrittener Leberzirrhose werden intravenöse Cephalosporine der 3. Generation, wie Ceftriaxon, empfohlen (Bernard, Grange et al. 1999; Fernandez, Ruiz del Arbol et al. 2006; de Franchis, Baveno et al. 2010).

Eine Therapie mit Beta-Blockern sollte in der Phase der akuten Varizenblutung

streng vermieden werden, da durch diese der Blutdruck gesenkt wird (Garcia-Tsao, Sanyal et al. 2007).

Eine frühe TIPS-Versorgung (TIPS = Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt) (innerhalb der ersten 72 Stunden) sollte bei Patienten mit hohem Risiko eines Therapieversagens nach initialer pharmakologischer und endoskopischer Therapie durchgeführt werden. Dies betrifft vor allem Patienten mit einem Child-Pugh Stadium C (10-13 Punkte) oder Child-Pugh Stadium B mit aktiver Blutung (de Franchis, Baveno et al. 2010; Garcia-Pagan, Caca et al. 2010; Bari and Garcia-Tsao 2012). Bei nicht kontrollierbarer Blutung kann eine Ballontamponade (Sengstaken-Sonde) als Überbrückungsmaßnahme bis zur definitiven Therapie für maximal 24 Stunden unter intensivmedizinischer Überwachung eingesetzt werden (de Franchis, Baveno et al. 2010; Wittenburg, Tennert et al. 2011; Bari and Garcia-Tsao 2012).

Die Prävention einer wiederholten Blutung wird als Sekundärprävention bezeichnet und sollte so früh wie möglich begonnen werden. Genau wie bei der Primärprävention wird eine Kombination aus NSBB und EVL empfohlen. Die Behandlung aus NSBB in Verbindung mit ISMN wird derzeit nicht vorgeschlagen mit Ausnahme von Patienten, die eine EVL verweigern oder diese nicht durchführbar ist (de Franchis, Baveno et al. 2010; Gluud, Langholz et al. 2010; Bari and Garcia-Tsao 2012). Jedoch bedarf es großer Meta-Analysen, die die Kombinationstherapie mit NSBB + ISMN genauer untersuchen. Es konnte nämlich durch verschiedene randomisierte Studien gezeigt werden, dass die Reblutungsrate 30-35% geringer war bei Patienten mit einer Kombinationstherapie im Vergleich zu einer Monotherapie mit NSBB (Bosch and Garcia-Pagan 2003; Garcia-Tsao, Sanyal et al. 2007).

Bei medikamentösem und endoskopischem Therapieversagen sollte die TIPS-Versorgung alternativ angeboten werden (Gerbes, Gulberg et al. 1998; Luca, D'Amico et al. 1999; de Franchis, Baveno et al. 2010; Bari and Garcia-Tsao 2012).

### **1.3.2 Aktuelle Konzepte zur Therapie von Aszites**

Eine zweite wichtige Komplikation ist die Bildung von Aszites. Bei kompensierter Leberzirrhose entsteht bei 30% der Patienten innerhalb der ersten 5 Jahre Aszites (Garcia-Tsao 2001).

Nach den S3-Leitlinien der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen) aus dem Jahr 2011 werden die folgenden Therapieschemata unterschieden (Gerbes, Gulberg et al. 2011):

- nicht medikamentöse Therapie
- medikamentöse Therapie
- Therapie bei refraktärem Aszites

#### Nicht medikamentöse Therapie:

Generell sollte Aszites nur bei klinisch symptomatischen Patienten therapiert werden. Bei alkohol-induzierter Leberzirrhose im Stadium Child-Pugh C führt die Abstinenz zu einer deutlich erhöhten drei Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit (Veldt, Laine et al. 2002; Runyon 2013). Des Weiteren sollte bei Patienten mit Leberzirrhose auf eine ausreichende Ernährung geachtet werden mit mindestens 25kcal pro kg pro Tag und eine Eiweißzufuhr von ca. 1,3g pro kg pro Tag. Eine Kochsalzrestriktion auf 5-6g/Tag sollte angestrebt werden. Übermäßige Salzzufuhr führt zur einer Verschlechterung des Krankheitsbildes und wird daher nicht empfohlen (Gerbes, Gulberg et al. 2011).

Bei ausreichender Natriumausscheidung kann die Aszitestherapie über die alleinige Kochsalzrestriktion erfolgen (Runyon 2013). Werden über die Nieren geringere Mengen Natrium (unter 80 mmol /24h) ausgeschieden, wird eine Diuretikatherapie empfohlen. Interessanterweise konnte durch eine randomisierte kontrollierte Studie gezeigt werden, dass eine Salzrestriktion unter Diuretikatherapie nicht erforderlich ist (Reynolds, Lieberman et al. 1978; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Jedoch wird bei Patienten mit refraktärem Aszites eine Kochsalzrestriktion zur Minimierung der Parazentesefrequenz angeraten (Gerbes, Gulberg et al. 2011).

Häufig findet man bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites eine Verdünnungshyponatriämie. In mehreren Studien konnte demonstriert werden, dass eine Hyponatriämie mit einer gesteigerten Mortalität innerhalb von 6 Monaten einher geht (Angeli, Wong et al. 2006; Biggins, Kim et al. 2006). Jedoch ist eine Kochsalzgabe nicht indiziert, da kein Ganzkörper-Natriummangel existiert. Es wird hingegen bei Patienten mit ausgeprägter Hyponatriämie eine Flüssigkeitsrestriktion angeraten (Gerbes, Gulberg et al. 2011). Diese Maßnahme geht jedoch mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einher und sollte daher nur in Ausnahmefällen langfristig durchgeführt werden (Gerbes, Gulberg et al. 2011).

### Medikamentöse Therapie:

Bei Patienten mit geringer Natriumausscheidung wird eine Diuretikatherapie empfohlen. Überwacht wird diese Therapie durch tägliches Wiegen des Patienten. Eine Reduktion des Körpergewichts von maximal 500g/Tag bei Patienten ohne periphere Ödeme oder maximal 1000g/Tag bei Patienten mit peripheren Ödemen sollte nicht überschritten werden (Pockros and Reynolds 1986; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Ziel der Therapie ist die Symptombefreiung des Patienten.

Initial sollte mit einem oralen Aldosteronantagonisten, wie Spironolacton in einer Dosis von 100mg/Tag begonnen werden und bei Bedarf bis maximal 400mg/Tag gesteigert werden (Moore, Wong et al. 2003; Gerbes, Gulberg et al. 2011; Wong 2012). Aufgrund des Hyperaldosteronismus bei Patienten mit Leberzirrhose kann durch Aldosteronantagonisten eine gesteigerte Natriurese im Vergleich zu Schleifendiuretika wie Furosemid erreicht werden (Wong 2012). Kann die Aszitesmenge durch eine Monotherapie nicht adäquat reduziert werden (unzureichendes Ansprechen von Spironolacton innerhalb der ersten zwei Wochen), wird eine Kombinationstherapie mit einem Schleifendiuretikum wie Furosemid oder Torasemid empfohlen (Gerbes, Gulberg et al. 2011). Die Dosis von Furosemid wird initial mit 40mg/Tag begonnen und kann bis zu 160mg/Tag gesteigert werden. Es ist jedoch bei diesen hohen Dosen mit einem vermehrten Auftreten von Nierenfunktionsstörungen und/oder Elektrolytstörungen wie Hypokaliämie und metabolische hypochlorämische Alkalose auszugehen (Moore, Wong et al. 2003; Gerbes, Gulberg et al. 2011). In einer Studie von Santos et al. wurde die Wirksamkeit und das Auftreten von Nebenwirkungen von Patienten mit Kombinationstherapie (initial: Spironolacton 100-200mg/Tag + Furosemid 40-80mg/Tag) und Patienten mit sequenzieller Behandlung (initial: Monotherapie mit Spironolacton 100-200mg/Tag, bei keiner adäquaten Aszitesmobilisation wurde Furosemid in 40-80mg/Tag hinzugefügt) bei neu aufgetretenem Aszites untersucht (Santos, Planas et al. 2003). Es konnte gezeigt werden, dass beide Therapien eine ähnliche Wirksamkeit erzielen, jedoch die Kombinationstherapie mit einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen einhergeht (Santos, Planas et al. 2003; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Bei 90% der zirrhotischen Patienten mit Aszites ist die Behandlung bestehend aus Salzrestriktion, Spironolacton und Furosemid erfolgreich (Gerbes, Gulberg et al. 2011). Bei adäquater Aszitesreduktion sollte die Diuretikadosis reduziert werden.

Eine typische Nebenwirkung der Spironolacton-Therapie ist die schmerzhafte

Gynäkomastie. Eine mögliche Alternative zu Spironolacton ist ein neuerer selektiver Mineralkortikoid-Rezeptor Antagonist, Eplerenon. Dieses um ein Vielfaches teurere Medikament ist nicht mit dem Risiko einer Gynäkomastie assoziiert (Dimitriadis, Papadopoulos et al. 2011). Ob Eplerenon vergleichbare Effekte erzielen kann wie Spironolacton, muss durch weitere Studien verifiziert werden (Gerbes, Gulberg et al. 2011).

#### Therapie bei refraktärem Aszites:

Therapierefraktärer Aszites ist, wie folgt, definiert:

Rezidivierender Aszites tritt trotz Natriumrestriktion und Verschreibung von Diuretika in adäquater Dosierung mindestens 3-mal in einem Zeitraum von 1 Jahr wieder auf (Arroyo, Gines et al. 1996; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Ein Nichtansprechen auf eine Natriumrestriktion und eine Diuretikatherapie in hoher Dosis (400mg/Tag Spironolacton und 160mg/Tag Furosemid) , wird als Diuretikaresistenz beschrieben (Arroyo, Gines et al. 1996).

Alle Patienten mit refraktärem Aszites und ohne Kontraindikationen sollten für eine Lebertransplantation evaluiert werden (Wong 2012). Für dieses Patientenkollektiv stehen zwei interventionelle Verfahren zur symptomatischen Therapie zur Verfügung. Zum einen kann die wiederholte großvolumige Parazentese oder eine Versorgung mit einer TIPS-Anlage durchgeführt werden. Bei der Durchführung einer Parazentese ist auf hämodynamische Veränderungen zu achten. Werden in einer Sitzung über 5 Liter Aszites entnommen, sollte parallel Albumin als Plasmaexpander gegeben werden, um eine Entgleisung des systemischen Kreislaufs durch die Volumendepletion zu verhindern (Gines, Tito et al. 1988; Gulberg and Gerbes 2003; Moore, Wong et al. 2003).

Die S3-Leitlinien aus dem Jahr 2011 sprechen tendentiell eine Empfehlung für die TIPS-Anlage gegenüber der rezidivierenden großvolumigen Parazentese aus (Gerbes and Gulberg 2006; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Gerbes et al. konnten zeigen, dass die TIPS-Anlage eine Verbesserung der Nierenfunktion bewirkte: diese ging einher mit

- a) einer Steigerung der Natriumexkretion und einer Erhöhung des Urinvolumens
- b) einer verbesserten Plasma-Kreatinin-Konzentration
- c) und einer verbesserten Plasma- Renin/Aldosteron – und Noradrenalin-Konzentration (Rossle and Gerbes 2010). Auch das Auftreten von

Sekundärkomplikationen der portalen Hypertension, wie die spontan bakterielle Peritonitis (SBP), das hepatorenale Syndrom und die gastrointestinale Blutung konnte durch die TIPS-Anlage im Vergleich zur Parazentese reduziert werden (Salerno, Camma et al. 2007; Gerbes, Gulberg et al. 2011). Des Weiteren wurde in zwei Meta-Analysen mit 305 Patienten eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit nach TIPS-Versorgung im Vergleich zur Parazentese demonstriert (Rossle, Ochs et al. 2000; Salerno, Camma et al. 2007; Rossle and Gerbes 2010). In einer weiteren Studie aus der Arbeitsgruppe Gülberg et al. wurde eine verbesserte Lebensqualität nach TIPS-Anlage beschrieben (Gulberg, Liss et al. 2002). Jedoch sollte nicht bei jedem Patienten mit refraktärem Aszites ein TIPS angelegt werden. Bei bestehenden Risikofaktoren, wie Alter >65 Jahren, bestehende hepatische Enzephalopathie, ein hoher MELD Score >15 und eine schlechte Leberfunktion bedarf es einer genauen individuellen Evaluation (Gerbes, Gulberg et al. 2011) (Gerbes and Gulberg 2004).

Relative und absolute Kontraindikationen für ein TIPS sind in den unten stehenden Tabelle aus der Arbeitsgruppe Wong et al. 2012 aufgeführt (Wong 2012).

<b>Absolute</b>	<b>Relative</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unkontrollierte Enzephalopathie</li> <li>• Herzinsuffizienz</li> <li>• Schwergradige pulmonale Hypertension</li> <li>• Child-Pugh Score <math>\geq 12</math></li> <li>• Multiple hepatische Zysten</li> <li>• Nicht therapierte Cholestase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alter &gt; 70Jahre</li> <li>• Infektion</li> <li>• Incompliance bzgl. Natrium-Restriktion</li> <li>• Neoplasien der Leber (vor allem zentral gelegen)</li> <li>• Pfortaderthrombose</li> </ul>

Abb.4) Absolute und relative Kontraindikationen für die TIPS-Anlage aus der Arbeitsgruppe Wong et al. (Wong 2012).

Einzigste kurative Therapieoption bei Patienten mit refraktärer Aszitesbildung ist jedoch die Lebertransplantation. Nicht nur die Überlebenswahrscheinlichkeit, sondern auch die Lebensqualität des Patienten kann so um ein Vielfaches erhöht werden.

## 1.4. Pathogenese der portalen Hypertension

### 1.4.1 Allgemeine Mechanismen

Die portale Hypertension entsteht initial durch eine Erhöhung des intrahepatischen Gefäßwiderstandes (IHVR). Grund hierfür ist:

- 1.) die Fibrosierung durch die massive Zunahme von extrazellulärer Matrix wie Kollagen, Proteoglykanen und Glykoproteinen
- 2.) eine Zunahme des portalen Blutflusses durch eine vermehrte Vasodilatation im Splanchnikusgebiet
- 3.) eine Störung der Mikrozirkulation im intrahepatischen Gefäßbett durch ein Überwiegen von Vasokonstriktoren, ein Mangel an dilatierenden Faktoren und ein verändertes Ansprechen auf Vasokonstriktoren und Vasodilatoren.

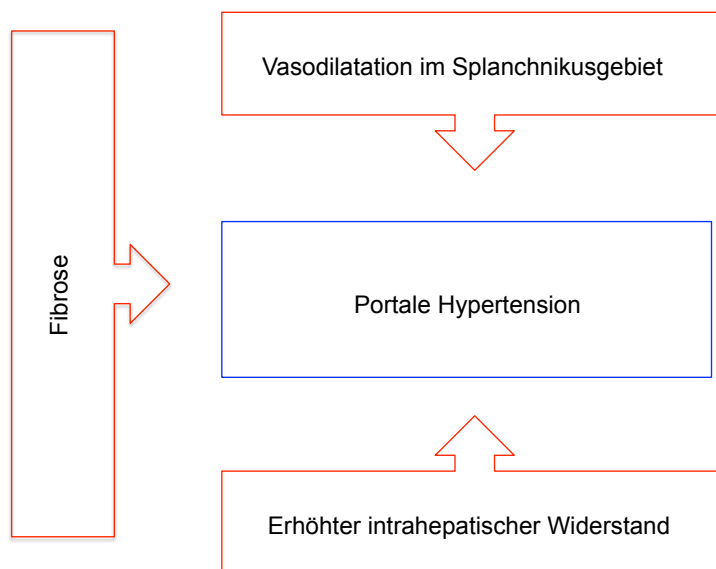


Abb.5) Pathophysiologie der portalen Hypertension

Nach dem *Ohmschen Gesetz* wird der Pfortaderdruck (P) proportional zum portalvenösen Blutfluss (Q) und Gefäßwiderstand (R) beschrieben (Reynaert, Thompson et al. 2002):

$$P = Q \times R$$

Nach dem *Hagen-Poiseuillesche Gesetz* wird der Gefäßwiderstand (R) von der



Viskosität ( $\eta$ ), der Gefäßlänge (L) und dem Radius (r) bestimmt. Ausschlaggebend für den Gefäßwiderstand ist nur der Radius (r), welcher in der 4. Potenz angegeben wird. Viskosität ( $\eta$ ) und Gefäßlänge (L) werden als konstant angenommen (Wiest, Lock et al. 2000).

$$R = \frac{8 \times \eta \times L}{\pi \times r^4}$$

Demnach spielt der Radius der Lebergefäße die entscheidende Rolle in der Entstehung des Gefäßwiderstandes. Da die Leber keinerlei Möglichkeiten besitzt, den zuführenden Blutstrom zu beeinflussen, gilt sie als „passiver Empfänger“ der einströmenden Blutmenge (2). Der zirrhotische Umbau bewirkt einen Verlust der Compliance (1) und damit die Fähigkeit ein größeres Blutvolumen im portalvenösen System aufzunehmen (Wiest, Lock et al. 2000).

Verstärkt wird die portale Hypertension durch eine Dysbalance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren im intrahepatischen Gefäßbett und im Splanchnikusgebiet. Über die vermehrte Ausschüttung von dilatierenden Substanzen im Bereich der Splanchnikusgefäße kommt es zu einem vermehrten Pooling venösen Blutes im prähepatischen Gefäßbett (2). Ganz im Gegensatz dazu führt die chronische Schädigung der Leber zu einer Störung der Mikrozirkulation im intrahepatischen Gefäßbett (3). Ein Überwiegen von Vasokonstriktoren innerhalb der Leber bewirkt eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes. Die Folge ist aufgrund des vermehrten Blutflusses und des erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstandes eine konsekutive Erhöhung des Pfortaderdrucks (P).

#### **1.4.2 Störungen der Mikrozirkulation im intrahepatischen Gefäßbett**

Verantwortlich für die portale Hypertension ist nicht nur der fibröse Umbau der Leberarchitektur, sondern auch die Störung der Mikrozirkulation.

Lange wurde angenommen, dass die portale Hypertension nur von der Fibrosierung, der Knotenbildung hervorgerufen durch die massive Einlagerung von extrazellulärer Matrix in den Disse-Raum abhängt. Heute weiß man, dass 30-40% des Pfortaderdrucks durch eine *dynamische Komponente* verursacht wird (Laleman, Landeghem et al. 2005). Beeinflusst wird diese Komponente durch nicht-

parenchymale Zellen, wie Hepatische Sternzellen (HSC), Kupfferzellen und sinusoidale Endothelzellen. Über kontraktile Eigenschaften der HSC (Kawada, Tran-Thi et al. 1993) und einer Überexpression von Vasokonstriktoren (Rockey 2003) verkleinert sich der sinusoidale Durchmesser (siehe Abb.6).

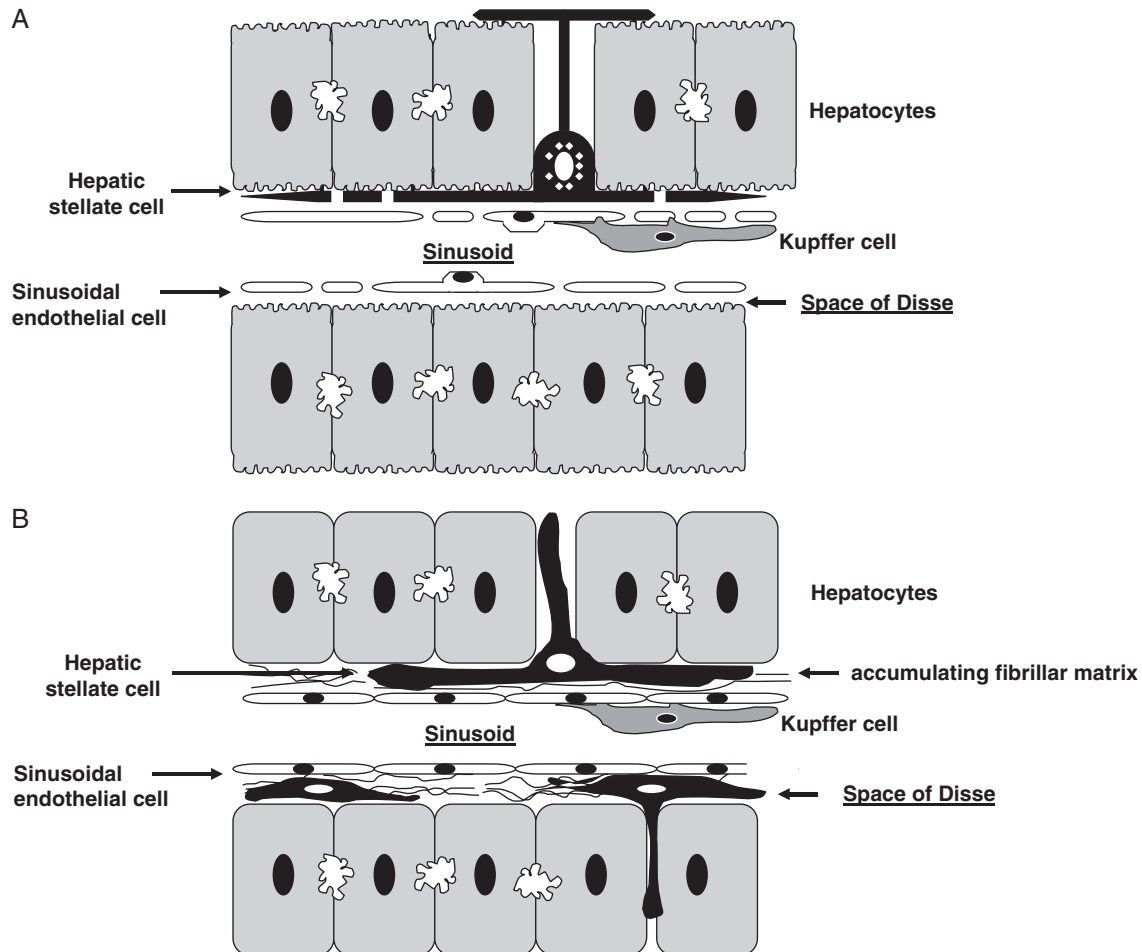


Abb.6) von Laleman et al 2005 (Laleman, Landeghem et al. 2005):

A: normale Leberarchitektur. B: Leberarchitektur bei chronischer Lebererkrankung mit Verlust der Endothelzellfenestration, Proliferation der Hepatischen Sternzellen, Vermehrung der extrazellulären Matrix im Disse-Raum und Verlust der Mikrovilli der Hepatozyten (Laleman, Landeghem et al. 2005)

#### 1.4.2.1 Beteiligte Zellen

Bedingt durch die chronische Entzündung der Leber werden nicht nur verschiedene Zellen aktiviert, es findet zusätzlich eine Interaktion der unterschiedlichen Zellpopulationen statt. Nicht-parenchymale Zellen kommen auch im

parasinusoidalem Raum (Disse-Raum) vor, mit Ausnahme der Kupfferzellen, diese liegen in den hepatischen Sinusoiden.

Hauptverantwortlich für die zellulär bedingte Erhöhung des IHVR sind die Hepatischen Sternzellen (HSC):

In dem Disse-Raum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen befinden sich die HSC. Sie haben lange zytoplasmatische Ausläufer und speichern in der gesunden Leber hauptsächlich Vitamin A (Reynaert, Thompson et al. 2002). In Folge einer chronischen Leberschädigung verlieren die HSC die mit Vitamin A gefüllten Vakuolen. Es kommt zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung der HSC mit vermehrter fibrogenetischer, kontraktile und immunmodulatorischen Aktivität (Laleman, Landeghem et al. 2005). Über die HSC vermittelte Chemotaxis werden weitere HSCs angelockt und zur Proliferation angeregt. Endothelin und Eicosanoide bewirken an den HSC eine Kontraktion der Myosinfilamente im Zytoskelett (Kawada, Klein et al. 1992; Kawada, Tran-Thi et al. 1993). Die Zellen nehmen eine kugelige Form an und vermindern dadurch den sinusoidalen Durchmesser. Die Folge ist eine Zunahme des IHVR (Reynaert, Thompson et al. 2002).

Einen weiteren Einfluss auf die portale Hypertension haben die sinusoidalen Endothelzellen (SEC):

Sie bilden die Grenze des Disse-Raums zum sinusoidalen Raum. Unter physiologischen Bedingungen weisen die Zellen eine Fenestrierung auf, um einen bidirektionalen Transport zwischen Hepatozyten und portal-venösen Blut gewährleisten zu können (Moreira 2007). Die chronische Leberschädigung führt in den SEC zur erhöhten Ausschüttung pro-inflammatorischer Substanzen wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) und Adhäsionsmolekülen. Diese Mediatoren bewirken den Verschluss der Fenestrierung der SEC, sowie den Verlust der Mikrovilli der Hepatozyten (Friedman 2004). Die Folge ist eine gestörte Eliminierung von Abfallprodukten aus den Hepatozyten sowie eine gestörte Aufnahme mit Nährstoffen aus dem portal-venösen Blut. Zusätzlich kommt es zu einer Hypoxie der Leberzellen, dies führt zu einer Stimulation angiogenetischer Signalwege. Diese Mechanismen führen zu einer Verschlechterung der sinusoidalen Durchblutung. Des Weiteren kommt es durch eine Dysfunktion der SEC zu einer verminderten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), einem potenten Vasodilatator, sowie zu einer verminderten Antwort auf NO. Im

Gegenzug werden die SEC über Entzündungsmediatoren, wie Endotoxine und oxidativen Stress, zu einer vermehrten Ausschüttung von Thromboxan A<sub>2</sub> (siehe 1.4.2.2) stimuliert (Iwakiri and Groszmann 2007). Zusätzlich rekrutieren und aktivieren die SEC über parakrine Mechanismen weitere HSCs (Iwakiri 2012). Das Ergebnis dieser Dysfunktion ist ein Überwiegen von Vasokonstriktoren aufgrund vermehrter aktiver HSCs sowie erhöhter Fibrosebildung.

Kupfferzellen (KC) gehören zu dem monozytären Phagozyten System und sind gewebständige Makrophagen der Leber. Anders als die HSC findet man die KC im Lumen der Lebersinusoide, anliegend an den SEC (Bilzer, Roggel et al. 2006). Ihre langen Zellausläufer reichen bis in den parasinusoidalen Raum, hier haben die KC Kontakt zu HCS und SEC sowie zu Hepatozyten. Sie sind Teil der dynamischen Komponente der portalen Hypertension. Die Aktivierung der KC erfolgt unter anderem über Endotoxine. Diese bewirken eine Ausschüttung von Vasokonstriktoren vor allem Sauerstoffradikalen, Leukotriene und Thromboxan A<sub>2</sub> (detaillierte Beschreibung siehe 1.5.). Die Folge ist eine Kontraktion intrahepatischer Gefäße mit einhergehender Widerstandserhöhung im portal-venösen System (Steib 2011).

#### **1.4.2.2 Vasokonstriktoren**

Vasoaktive Substanzen spielen in der Entstehung und Aufrechterhaltung der portalen Hypertension als Folge der Leberzirrhose eine wichtige Rolle. Vor allem das Überwiegen von vasokonstriktorischen Faktoren und die überhöhte Zellantwort („hyper-responsiveness“) auf diese Mediatoren im hepatischen Gefäßbett erhöht den IHVR und führt konsekutiv zur portalen Hypertension. Gleichzeitig kommt es zu einer intrahepatischen Abnahme dilatierender Substanzen, wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO) (Laleman, Landeghem et al. 2005).

Die wichtigsten hier zu nennenden Vasokonstriktoren sind:

- Eicosanoide : Leukotriene und Thromboxan A<sub>2</sub>

Eicosanoide sind Mediatoren mit entweder vasodilatierender oder vasokonstriktiver Wirkung. Grundbaustein dieser biologisch aktiven Substanzen ist die Arachidonsäure (AA). Phospholipase A<sub>2</sub> ist für die Freisetzung der AA aus membranösen

Phospholipiden verantwortlich. Über die Cyclooxygenase-1 und -2 (COX) wird die AA zu Prostaglandin-H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) metabolisiert. COX-1 ist ein konstitutives Enzym, was unter physiologischen Bedingungen in fast allen Geweben exprimiert wird. Die Bildung von COX-2 wird vor allem durch inflammatorische Reize, wie Zytokinen und Endotoxinen stimuliert (Graupera, Garcia-Pagan et al. 2003; Bosch, Abrales et al. 2010). In der zirrhotischen Leber konnte eine vermehrte Bildung von COX-2 gefunden werden (Graupera, Garcia-Pagan et al. 2003). An peritonealen Rattenmakrophagen konnte gezeigt werden, dass COX-2 bevorzugt PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> katalysiert im Vergleich zu COX-1, welche Thromboxan A<sub>2</sub> und PGD<sub>4</sub> bilden (Ueno, Murakami et al. 2001). Dies könnte eine Erklärung für die vermehrte exprimierte COX-1 bei erhöhter Thromboxanbildung sein. Eine gesteigerte Aktivität von COX-1 konnte in Kupfferzellen am Modell der zirrhotischen Rattenleber gezeigt werden (Steib, Gerbes et al. 2007; Bosch, Abrales et al. 2010).

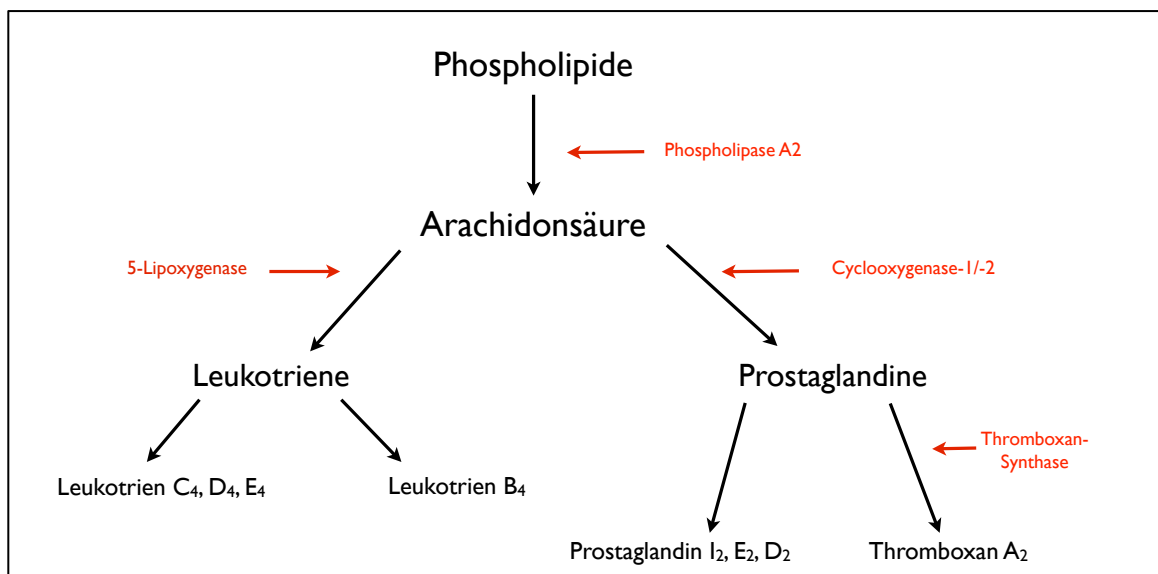


Abb.7) Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> und Leukotriene *detaillierte Erklärung im Text* (modifiziert aus Dissertation op den Winkel 2008) .

Thromboxan A<sub>2</sub> wird hauptsächlich von den Kupfferzellen und in geringen Mengen auch von den SEC gebildet. Vor allem in der entzündlichen und zirrhotisch veränderten Leber wurde eine vermehrte Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> aus den KC beobachtet (Steib, Gerbes et al. 2007). Die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> wird über die Thromboxansynthase vermittelt (siehe Abbildung). Aufgrund seiner großen Instabilität zerfällt es sehr schnell in inaktives Thromboxan B<sub>2</sub>. Thromboxan A<sub>2</sub>

bewirkt eine Aktivierung und Kontraktion der HSC (Kawada, Klein et al. 1992). Durch die Kontraktion der HSC nehmen diese vermutlich eine rundliche Form an und schieben die SEC in das Lumen der Sinusoide. Die Folge ist eine Abnahme des sinusoidalen Durchmesser mit einhergehender Erhöhung des IHVR.

Weitere wichtige Vasokonstriktoren sind die Gruppe der Leukotriene (LT). Sie stammen von den Eicosanoiden ab und besitzen genau wie Thromboxan A<sub>2</sub> potente vasokonstriktorische Eigenschaften. Schlüsselenzym der LT ist die 5-Lipoxygenase (5-LOX) (siehe Abbildung oben). Durch die Verstoffwechslung von AA über 5-LOX entsteht Leukotriene A<sub>4</sub>. Über Hydrolyse oder Konjugation mit Glutathion werden Leukotrien B<sub>4</sub> und C<sub>4</sub> gebildet (Samuelsson, Dahlen et al. 1987). Über weitere Enzymeinwirkungen werden die LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> katalysiert. In Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Zirrhosemodellen an der Rattenleber zeigte sich eine vermehrte Expression von Cysteinyl-Leukotrienen LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> (Graupera, Garcia-Pagan et al. 2002). Ein besonders ausgeprägter vasokonstriktorisches Wirkmechanismus wurde dieser Gruppe zugesprochen (Bilzer and Lauterburg 1993). Nicht nur die Bildung von Leukotrienen ist in der zirrhotischen Leber sondern auch die Expression des Schlüsselenzyms 5-LOX ist in den KC erhöht (Graupera, Garcia-Pagan et al. 2002). Interessanterweise konnte lediglich eine LTA<sub>4</sub> Bildung in den KC festgestellt werden. Das vasoaktive LTC<sub>4</sub> wurde in großen Mengen in Hepatozyten gebildet. Es entstand die Hypothese, dass durch die KC gebildete LTA<sub>4</sub> über transzellulärem Weg in die Hepatozyten transportiert und anschließend zu LTC<sub>4</sub> umgewandelt wird (Titos, Claria et al. 2000). Anschließend entfaltet LTC<sub>4</sub> seine vasokonstriktorische Wirkung in die Lebersinusoide.

#### **1.4.3 Veränderungen im systemischen Kreislauf**

Die portale Hypertension führt zu einem hyperdynamen Zirkulationssyndrom. Ganz im Gegensatz zur intrahepatischen Zirkulationsstörung mit Mangel an Vasodilatoren und massiver Bildung von Vasokonstriktoren ist das Bild der extrahepatischen Zirkulationsstörung von einem Überangebot an relaxierenden Mediatoren geprägt. Es kommt zu einem gesteigerten Pooling venösen Blutes im Splanchnikusgebiet (Wiest, Lock et al. 2000; Hennenberg, Trebicka et al. 2008). Konsekutiv zeigt sich im Umkehrschluss ein effektiver Verlust des arteriellen Blutvolumens. Diesem Verlust

wird durch einen erhöhten Cardiac Output, durch die Aktivierung des Sympathikus, sowie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) reflektorisch entgegengewirkt. Dies hat wiederum zur Folge, dass die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Niere erniedrigt und die Natrium Resorption (+ Wasser) im Tubulussystem erhöht wird. Das Plasmavolumen wird über diesen Mechanismus erhöht. Dieses Volumen versackt in den Mesenterialgefäßen aufgrund eines Überangebots von Vasodilatoren wie Glucagon, NO, CO, PGI<sub>2</sub> (Garcia-Pagan, Gracia-Sancho et al. 2012).

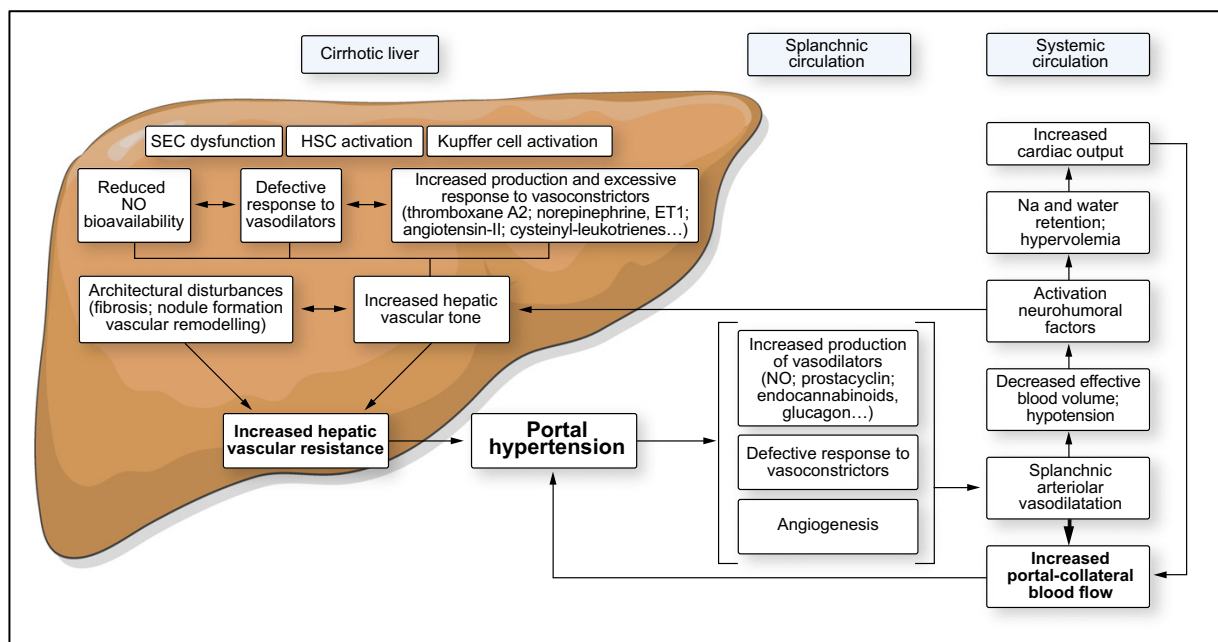


Abb.8) Garcia-Pagan et al. (Garcia-Pagan, Gracia-Sancho et al. 2012): Schematische Darstellung der intra- und extrahepatischen Zirkulationsstörung. *Detaillierte Beschreibung im Text*

Aufgrund der entstehenden Schubspannung (Shear Stress) im mesenterialen Gefäßbett wird die Expression und Aktivierung von eNOS induziert. Zusätzlich wird die Bildung von NO über LPS-getriggerte TNF- $\alpha$  Ausschüttung stimuliert. Die Folge ist ein Überangebot an NO mit massivem Pooling venösen Blutes im prähepatischen Stromgebiet (Hennenberg, Trebicka et al. 2008).

Neben der enormen Bildung von Vasodilatoren scheint die glatte Gefäßmuskulatur vermindert auf Vasokonstriktoren zu reagieren. Grund hierfür könnte der vermindert exprimierte RhoA/Rho-Kinase Signalweg sein, über den es zu einer Hypokontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur kommt (Hennenberg, Biecker et al.

2006).

Des Weiteren konnte an Tiermodellen mit induzierter portale Hypertension eine vermehrte Expression von COX nachgewiesen werden. Diese produzieren im mesenterialen Gefäßsystem hauptsächlich vasodilatierende Prostanoiden wie PGI<sub>2</sub> (Potenza, Botrugno et al. 2002). Des Weiteren spielen COX eine Rolle in der Regulation proangiogenetischen Mediatoren wie VEGF. VEGF ist für die Ausbildung portosystemischer Shunts und der Ausbildung von Varizen verantwortlich (Huang, Wang et al. 2012).

Über diese Mechanismen kommt es zu einer weiteren Erhöhung des portalen Drucks und zu einem verminderten Druck im systemischen Kreislauf. Der relative Volumenmangel im systemischen Kreislauf stimuliert die Ausschüttung von neurohumeralen Mediatoren (Garcia-Pagan, Gracia-Sancho et al. 2012). Es entsteht ein Circulus Vitiosus, welcher bis zum Leber- und oder Nierenversagen führen kann.

## **1.5 Kupfferzellen und deren Einfluss auf die portale Hypertension**

Kupfferzellen (KC) sind gewebeständige Makrophagen. Diese Zellgruppe ist heterogen und zeigt ein hohes Maß an Plastizität. Als Antwort auf Gewebeschädigungen kommt es zur Aktivierung spezifischer Signalwege in den Makrophagen mit Ausbildung zweier unterschiedlicher Zellpopulationen. Klassisch aktivierte Makrophagen (M1) werden über  $\beta$ -Glucane von Bakterien, Pilzen und Endotoxinen und Zytokine wie Interferon- $\gamma$  aktiviert und bilden als Zellantwort proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-12 und Sauerstoffradikale (Mosser 2003). M1-Makrophagen sind vor allem für die Abwehr pathogener Bestandteile verantwortlich.

Daneben spielt die Aktivierung und Ausbildung in M1 in der Pathogenese von chronischen Entzündungen, wie sie bei der Leberzirrhose zu finden ist, eine bedeutende Rolle (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011).

Die Ausbildung alternativ aktivierter Makrophagen (M2) findet über T-Helfer Zellen via Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) statt (Edwards, Zhang et al. 2006). Über noch ungeklärte Signalwege werden anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) ausgeschüttet. Die Folge ist eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokinsynthese wie Interferon- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Aufgrund des



großen plastischen Potentials können sich Makrophagen je nach Stimulation in die Gruppe M1 oder M2 umwandeln (Mosser and Edwards 2008).

Aktuelle Forschungsarbeiten belegen, dass vor allem bei äthyltoxischer Leberzirrhose und bei der portalen Hypertension die Permeabilität im gastrointestinalen Trakt gestört ist und vermehrt Mikroorganismen, Pilze und bakterielle Bestandteile in das portale Blut übergehen (Ramachandran and Balasubramanian 2001). Die Folge ist eine massive Aktivierung und Rekrutierung von KC.

Lipopolysaccharide (LPS), ein Zellwandbestandteil gram negativer Bakterien interagiert mit dem löslichen LPS-bindenden Protein mit einem Rezeptorkomplex bestehend aus dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) sowie Cluster of Differentiation 14 (CD14) (Wheeler 2003). Über eine intrazelluläre Signalkaskade wird im Zellkern der Nuklearfaktor Kappa B (NF $\kappa$ B) aktiviert (Wheeler 2003). Dies hat eine Induktion von proinflammatorischen Mediatoren zur Folge. Es werden Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), -6 (IL-6) und freie Radikale, wie Stickstoffmonoxid (NO), sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (siehe Abbildung) ausgeschüttet. Am Modell der fibrotischen Rattenleber wurde der ROS, im Besonderen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potente vasokonstriktive Eigenschaften zugesprochen. Des Weiteren konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivierend auf KC wirkt und die Produktion von TXA<sub>2</sub> erhöht (Steib, Bilzer et al. 2010).

Nicht nur LPS führt zu einer Aktivierung von KC, sondern auch Komplement-Faktoren C3a und C5a (Bilzer, Roggel et al. 2006). Die Faktoren C3a oder C5a interagieren mit einem G-Protein gekoppelten Rezeptor. Phospholipase C und Protein Kinase C werden aktiviert und induzieren über weitere Reaktionsschritte die Bildung von Sauerstoffradikalen über die NADPH Oxidase, sowie die Bildung von Eicosanoiden über Stimulation der COX-1 und -2 (Bilzer, Roggel et al. 2006). Hier ist vor allem die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) zu nennen. Hauptbildungsort dieses potenten Vasokonstriktors sind die KC (Kolios, Valatas et al. 2006). TXA<sub>2</sub> ist maßgeblich verantwortlich für die Entstehung und Aufrechterhaltung der portalen Hypertension (Yokoyama, Xu et al. 2003; Steib, Gerbes et al. 2007). Neben TXA<sub>2</sub> bilden KC vasokonstringierende Leukotriene (siehe oben). TNF- $\alpha$  induziert eine vermehrte Bildung von NOS (Wiest and Groszmann 2002) und COX (Munoz, Albillos

et al. 1999) . Dieser Effekt verstärkt den oxidativen Stress und die  $\text{TXA}_2$  Ausschüttung im sinusoidalen Stromgebiet mit dem Ergebnis einer Erhöhung des IHVR in der Leber.

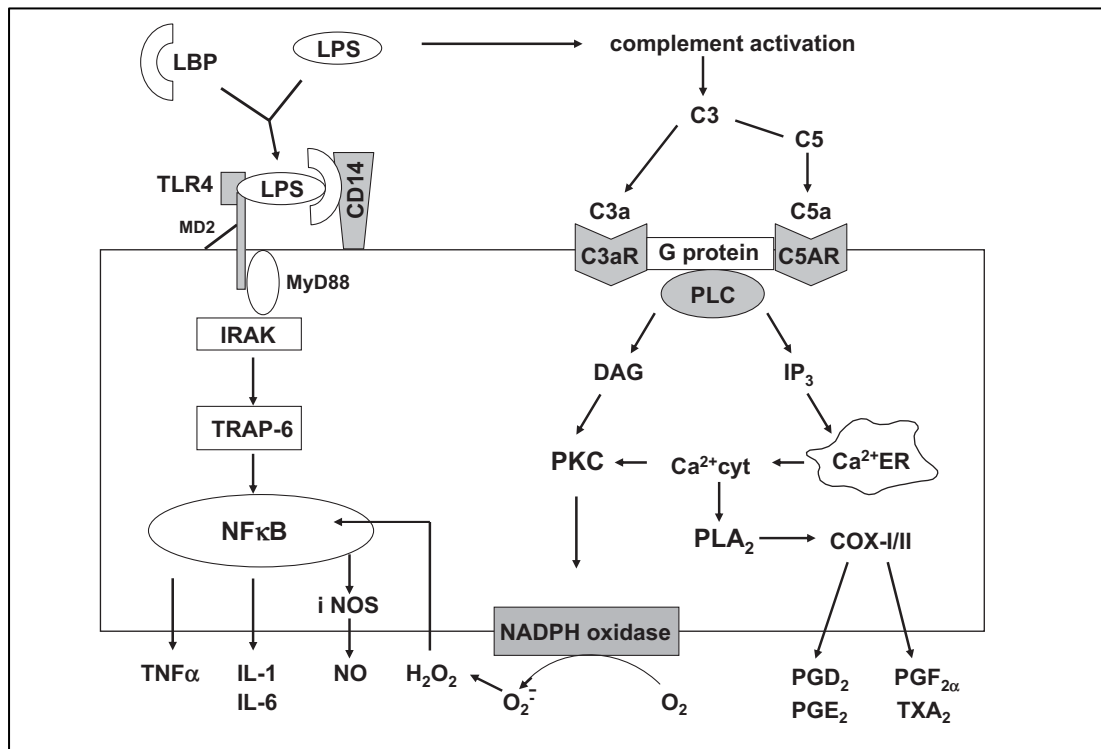


Abb.9) von Bilzer et al. 2006 (Bilzer, Roggel et al. 2006): **Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung der Kupferzelle mittels LPS und aktivierter Komplement Faktor 3 oder 5.**

*C3 und C5, Komplement Faktoren 3 und 5; C3a und C5a, aktivierte Komplement Faktoren 3 und 5; CD14, CD 14 Rezeptor; DAG, Diacylglycerol;  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Wasserstoff Peroxid; iNOS, induzierbare NO- Synthase; IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6;  $\text{IP}_3$ , Inositol-3- Phosphat; IRAK, Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase; LBP, LPS-Bindungs Protein; LPS, Lipopolysaccharid; NFκB, Nukleärer FaktorkB; PKC, Protein Kinase C; PLA<sub>2</sub>, Phospholipase A2; PLC, Phospholipase C; TLR4, Toll-like Rezeptor 4;  $\text{TNF}\alpha$ , Tumor Nekrose Faktor α; TRAF-6, TNF aktivierter Faktor 6. Detaillierte Beschreibung siehe Text.*

Der genaue Mechanismus der Differenzierung der Makrophagen in eine M2-Population ist bisher noch nicht geklärt. Ein weiteres Indiz für das anti-inflammatorische Potential der M2-Makrophagen ist seine Verwertung von Arginin. M2 induziert das Enzym Arginase, über das die Radikalbildung umgangen wird. Im Vergleich zu M2 produzieren M1-Makrophagen über die induzierbare NO-Synthase

das freie Radikal NO (Mosser 2003). Weitere Studien zeigten, dass die anti-inflammatorisch wirksame Hämoxxygenase-1 in M2-Zellen vermehrt exprimiert wird im Vergleich zu M1-Zellen und diese die Synthese von IL-10 anregt (Sierra-Filardi, Vega et al. 2010).

Des Weiteren konnte speziell in KC die Bildung von Prostanoiden wie PGE<sub>2</sub> mit inhibitorischer Wirkung auf die Prostaglandinsynthese und die TNF- $\alpha$  Produktion gezeigt werden (Decker 1990; Bilzer, Roggel et al. 2006). Jedoch überwiegen die inflammatorischen und konstriktorischen Mediatoren in der zirrhotischen Leber, was zu einer konsekutiven Erhöhung des portalen Drucks führt. Eine vermehrte Stimulation des M2-Phänotyps der Kupfferzellen und damit die vermehrte Produktion von anti-inflammatorischen Mediatoren könnte eine Therapieoption für Patienten mit Leberzirrhose und portaler Hypertension sein.

## **1.6 Einfluss von Cannabinoiden und deren Agonisten auf die Leberzirrhose und die portale Hypertension**

Cannabinoiden können positive und negative Effekte auf die Entstehung und den Verlauf der akuten und chronischen Leberschädigung haben (Huang, Wang et al. 2012). Liganden der Cannabinoid-Rezeptoren sind endogen produzierte Cannabinoide sowie die bekannten Phytocannabinoiden wie  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol (THC) aus der Cannabis-Sativa Pflanze (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2011). Endogene Cannabinoide sind lipophile Derivate der AA. Anandamide (AEA) und 2-Arachidonyl-Glycerol (2-AG) sind die derzeit am besten charakterisierten endogenen Cannabinoide und partizipieren in der Genese der Leberzirrhose sowie der portalen Hypertension (Yang, Lin et al. 2006; Siegmund 2010). Sie werden in Hepatozyten und nicht parenchymalen Zellen gebildet und in der normalen Leber über die stark exprimierte Fettsäureamid Hydrolase (FAAH) und über die Monoacylglycerol Lipase abgebaut (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2011). Allerdings ist die Expression von FAAH und ihre Aktivität in der zirrhotischen Leber vermindert, dies resultiert in einem erhöhten Angebot an AEA (Huang, Quinn et al. 2011).

Bislang wurden zwei verschiedene Cannabinoid-Rezeptoren charakterisiert. Cannabinoid-Rezeptor-1 (CB<sub>1</sub>-Rezeptor) kommt primär im zentralen Nervensystem (ZNS) vor (Matsuda, Lolait et al. 1990). Dieser ist hauptsächlich für die psychotropen

Symptome nach Marihuana Konsum verantwortlich (Di Marzo 2008). Unter physiologischen Bedingungen kann eine minimale Expression des CB<sub>1</sub>-Rezeptors im peripheren Nervensystem, im kardiovaskulären System, sowie in der Leber nachgewiesen werden (Gebremedhin, Lange et al. 1999; Batkai, Pacher et al. 2004; Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006). Im Gegensatz zur gesunden Leber werden in der zirrhotischen Leber CB<sub>1</sub>-Rezeptoren stark exprimiert. Experimente mit Zellisolationen ergaben eine vermehrte CB<sub>1</sub>-Rezeptor Expression in HSC, in Myelofibroblasten, in SEC und Hepatozyten (Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006; Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2011). CB<sub>1</sub>-Rezeptoren haben proinflammatorische Fähigkeiten. In Studien am Mausmodell konnte durch die Antagonisierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors eine signifikant verminderte Fibrosebildung nach Applikation von CCL<sub>4</sub> im Vergleich zur Kontrollgruppe demonstriert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden in CB<sub>1</sub>-/- knock out Mäusen gezeigt (Teixeira-Clerc, Julien et al. 2006). Zusätzlich scheint die Aktivierung von CB<sub>1</sub>-Rezeptoren die Ausbildung einer portalen Hypertension und Aszites zu begünstigen. AEA besitzen eine hohe Affinität zu dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor und werden im Rahmen der Leberzirrhose vermehrt gebildet (Pacher, Batkai et al. 2006). AEA führt in der zirrhotischen Rattenleber zu einer gesteigerten Aktivität von COX und 5-LOX mit vermehrter Ausschüttung von TXB<sub>2</sub> und Cys-LT (Yang, Lin et al. 2006). Die Folge ist eine Steigerung des IHVR. In weiteren Tiermodellen konnte mittels einmaliger intravenöser Injektion spezifischer CB<sub>1</sub>-Rezeptor Antagonisten der portal-venöse Druck gesenkt werden (Batkai, Jarat et al. 2001; Ros, Claria et al. 2002). Dies verdeutlicht den Effekt der CB<sub>1</sub>-Rezeptoren in der zirrhotischen Leber. Da bisherige CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie Rimonabant zu starken psychischen Nebenwirkungen führen, scheint dieser Ansatzpunkt nicht die optimale Therapieoption zu sein.

Im Gegensatz zu den CB<sub>1</sub>-Rezeptoren mit proinflammatorischen Eigenschaften werden Cannabinoid-Rezeptoren 2 (CB<sub>2</sub>-Rezeptor) anti-inflammatorische Effekte zugeteilt (Teixeira-Clerc, Belot et al. 2010). Auch sie zeigen eine starke Expression bei chronischen und akuten Entzündungen und sind unter physiologischen Bedingungen kaum darstellbar (Julien, Grenard et al. 2005).

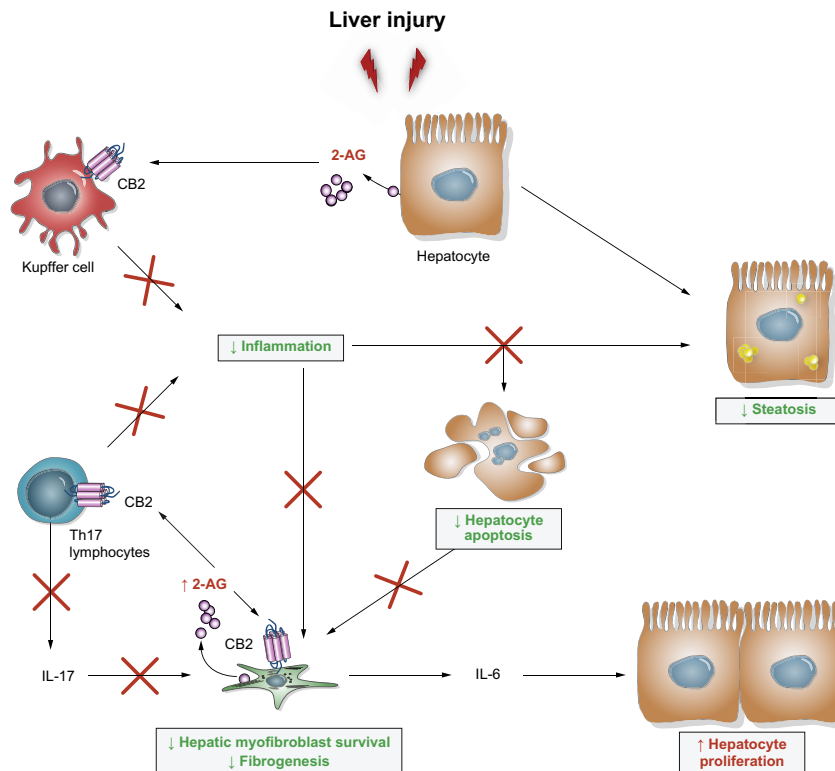


Abb.10) Über den CB<sub>2</sub>-Rezeptor gesteuerte protektive Effekte aus der Arbeitsgruppe Mallat et al. 2013 (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013): CB<sub>2</sub>-Rezeptoren werden in Immunzellen exprimiert (Kupfferzellen, hepatische Myofibroblasten und Lymphozyten) und zeigen hier anti-inflammatorische Wirkungen in Bezug auf die Steatose, die Apoptose von Hepatozyten und die Fibrogenese.

CB<sub>2</sub>-Rezeptoren kommen hauptsächlich in Immunzellen vor und lassen sich in der zirrhotischen Leber in Kupfferzellen und hepatischen Myofibroblasten darstellen (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2011).

Das anti-inflammatorische Potential konnte in chronischen Erkrankungen wie Atherosklerose und chronisch entzündliche Darmerkrankungen nachgewiesen werden (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2011). Auch in der Leber scheint die Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors protektive Wirkung zu haben. Untersuchungen am Modell des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens konnte mittels Vorbehandlung eines spezifischen CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und die Infiltration neutrophiler Granulozyten reduziert werden (Batkai, Osei-Hyiaman et al. 2007). Des Weiteren scheinen CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten Einfluss in der Entstehung von portosystemischen Kollateralen zu haben. Vascular-endothelial-growth-factor (VEGF), Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) und Angiopoietin-2 triggern die

Neovaskularisation in der Leber und im Splanchnikusgebiet. CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten verringern die Expression dieser Mediatoren und führen so zu einem verminderten portal-venösen Zustrom sowie zu einem erhöhten arteriellen Widerstand im Splanchnikusgebiet (Huang, Wang et al. 2012). Zusätzlich wird über CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten die Synthese von COX-1, COX-2 und ihre Expression sowie eNOS verringert (Huang, Wang et al. 2012). Des Weiteren wurde in der gleichen Arbeitsgruppe von Huang et al. beschrieben, dass die chronische Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Agonisten eine Reduktion des portalen Drucks induziert (Huang, Wang et al. 2012). Es besteht die Hypothese, dass CB<sub>2</sub>-Agonisten eine hemmende Wirkung auf die Expression proangiogenetischer Faktoren, wie VEGF (= Vascular Endothelial Growth Factor) haben. Bedingt durch die verminderte Angiogenese und die verminderte Ausbildung von portosystemischen Kollateralen führt dies zu einer Reduzierung des portalen Drucks (Huang, Wang et al. 2012). In einer weiteren Studie am Rattenmodell mit BDL-induzierter Leberzirrhose von Lin et al. 2011 konnte der portale Drucks mittels CB<sub>2</sub>-Agonisten Behandlung reduziert werden (Lin, Yang et al. 2011). Hier konnte gezeigt werden, dass CB<sub>2</sub>-Agonisten eine verstärkte Vasorelaxation mit gesteigerter NO-Bildung induzieren. Diese ersten Forschungsergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Agonisten eine funktionelle Rolle bei zirrhotisch-bedingter portaler Hypertension haben.

Zusätzlich scheint die Aktivierung von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren Einfluss auf die Fibrogenese zu haben. Über Stimulation des CB<sub>2</sub>-Rezeptors bei Mäusen mit CCL4 induzierter Fibrose konnte im Vergleich zu Kontrollgruppen eine signifikante Reduzierung der Fibrogenese gezeigt werden. Die genauen Mechanismen sind noch nicht im Einzelnen geklärt, jedoch soll die Inhibition der COX-2 und die CB<sub>2</sub>-Rezeptor induzierte apoptotische Wirkung auf HSC eine Rolle spielen (Julien, Grenard et al. 2005). In einer weiteren Studie von Louvet et al. 2011 konnte durch die Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Agonisten eine Reduktion der alkohol-induzierten Steatose demonstriert werden (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Ein weiteres Ergebnis dieser Studie an zirrhotischen Mäuselebern war der stimulierende Effekt von CB<sub>2</sub>-Agonisten auf die Hämoxygenase-1, ein stress-induziertes Protein mit potenter protektiver anti-inflammatorischer und zytoprotektivem Effekt (siehe 1.7).

Zusammenfassend scheinen CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten protektive Effekte in der Leber zu haben, jedoch sind die genauen Mechanismen noch nicht bekannt.

## 1.7 Wirkungen der Hämoxxygenasen in der zirrhotischen Leber

Hämoxxygenasen (HO) sind die Schlüsselenzyme der Bilirubin Metabolisierung. Substrat für die HO ist das Protohäm IX aus dem Hämoglobin der Erythrozyten (Suematsu and Ishimura 2000). Die HO spalten Kohlenstoffmonoxid und Eisen aus dem Häm-Molekül ab. Es entsteht Biliverdin. In einem weiteren Reaktionsschritt wird über die Biliverdin Reduktase Bilirubin gewonnen. Bis heute sind drei verschiedene Isoformen der HO bekannt: HO-1, auch bekannt als Heat-Shock-Protein-32, wird über mehrere Stimuli wie Zytokine, ROS, das Substrat Protohäm IX und Hypoxie induziert und kommt unter physiologischen Bedingungen vor allem in KC und in sehr geringen Mengen in Hepatozyten vor (Naito, Hasegawa et al. 2004). HO-2 ist ein konstitutives Enzym und wird in parenchymalen und nicht parenchymalen Zellen der Leber exprimiert (Bauer, Wanner et al. 1998). Anders als die HO-1 steigt die Expression der HO-2 nicht nach Stimulation. In der gesunden Leber ist sie hauptverantwortlich für die Metabolisierung des anfallenden Häms (Maines 1988; Bauer, Wanner et al. 1998). HO-3 spielt eine untergeordnete Rolle und zeigt nur geringe katalytische Aktivität (Suematsu and Ishimura 2000).

In der zirrhotischen Leber wird die HO-1 vermehrt in KC und vor allem in Hepatozyten exprimiert (Fernandez and Bonkovsky 1999). Heute weiß man, dass die HO-1 protektive Wirkung auf die hepatische Mikrozirkulation hat:

- 1.) Die Produkte der HO-1, Biliverdin und Bilirubin, besitzen die Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu beseitigen (antioxidativer Abwehrmechanismus) (Makino, Suematsu et al. 2001)
- 2.) Via Stimulation (z.B. Hemin) steigert die HO-1 ihre Aktivität und Expression in der gesunden, als auch in der zirrhotischen Rattenleber (Van Landeghem, Laleman et al. 2009)
- 3.) HO-1 scheint eine hemmende Wirkung auf die NF $\kappa$ B Aktivität und damit auch auf die TNF- $\alpha$  Ausschüttung zu haben (Lee, Luo et al. 2009; Yang, Zhao et al. 2012)
- 4.) HO-1 produziert als Nebenprodukt vasoaktives Kohlenstoffmonoxid (CO).

Die Wirkung von CO ist ähnlich wie NO, es wirkt relaxierend auf die glatte Muskulatur über ein vermehrtes Angebot von cGMP via löslicher Guanylatzyklase (Carvajal, Germain et al. 2000; Steib, Gmelin et al. 2013). Zusätzlich aktiviert CO kalzium-abhängige Kaliumkanäle in der glatten Gefäßmuskulatur. Die Zellmembran wird

hyperpolarisiert und löst dadurch eine Relaxation der Gefäßmuskulatur aus (Wang and Wu 1997). In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe demonstrierten wir, dass durch Kupfferzell-Aktivierung mittels Zymosan und Hemmung der HO-1 der portale Perfusionsdruck signifikant gesteigert wurde (Steib, Gmelin et al. 2013). Hingegen führte die Behandlung mit CO zu einer Senkung des portalen Perfusionsdruck um 40% (Steib, Gmelin et al. 2013).

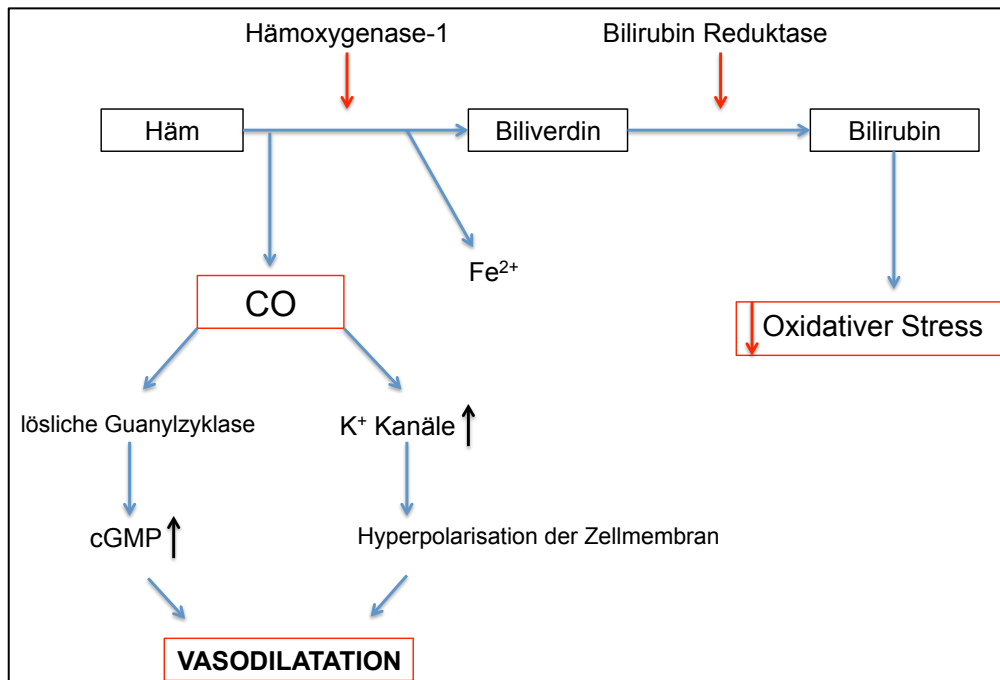


Abb.11) Mechanismen der Hämoxxygenase-1 und Einfluss von Kohlenstoffmonoxid (CO).  
Detaillierte Beschreibung im Text.

Der HO-1 können deutlich protektive Mechanismen zugesprochen werden, jedoch wurde in neuesten Studien gezeigt, dass die Expression und die Aktivität am Modell der zirrhotischen Rattenleber im Vergleich zu gesunden Tieren vermindert ist (Van Landeghem, Laleman et al. 2009).

Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass es bei der chronischen Leberschädigung zu einem Überwiegen des M1-phänotyps der KC-Population kommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in M2-Phänotypen die HO-1 Expression und Aktivität höher ist als im M1-Phänotyp (Sierra-Filardi, Vega et al. 2010).

Zusätzlich scheinen anti-inflammatorisch wirksame CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten aktivierende Effekte auf die HO-1 zu haben (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Jedoch ist der genaue Zusammenhang zwischen CB<sub>2</sub>-Agonisten und HO-1 im



Einzelnen noch nicht bekannt.

Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden, ob der CB<sub>2</sub>-HO-1 Signalweg eine funktionelle Relevanz auf die portale Hypertension hat und dadurch ein protektiver Effekt auf die Entstehung der portalen Hypertension erzielt werden kann.

## 2. Fragestellung

Die portale Hypertension ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose. Es gilt daher die Pathophysiologie dieser Erkrankung besser zu verstehen und dadurch potentielle neue therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu identifizieren. Cannabinoiden werden anti-inflammatorische Eigenschaften zugesprochen (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013). Ziel dieser Arbeit war einerseits, den Einfluss von Cannabinoid-Agonisten auf die portale Hypertension zu analysieren. Andererseits untersuchten wir einen neuen möglichen Signalweg zwischen Cannabinoid-Rezeptor 2 und der Hämoxygenase-1 und dessen Effekt auf die Ausschüttung des Vasokonstriktors Thromboxan A<sub>2</sub>.

Wir haben uns mit folgenden Fragen beschäftigt:

1. Können Cannabinoid-Rezeptor 2 Agonisten den portalen Druck *in vivo* am Modell der zirrhotischen Rattenleber senken?
2. Welche Rolle spielt der Cannabinoid-Rezeptor 2 Agonist JWH-133 in der isolierten Kupferzelle für die Produktion des Vasokonstriktors Thromboxan A<sub>2</sub>?
3. Existiert in der *zirrhotischen* Rattenleber der Cannabinoid-Rezeptor 2/Hämoxygenase-1-Signalweg?
4. Besitzt der Cannabinoid-Rezeptor 2/Hämoxygenase-Signalweg eine *funktionelle* Rolle in der zirrhotischen Rattenleber?

### **3. Methoden**

#### **3.1 Tierversuche**

Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern nach dem Tierschutzgesetz (TierschG) nach §9 Abs. 1 Satz 4 TierSchG genehmigt. Die Tierhaltung und alle durchgeführten Untersuchungen wurden entsprechend des Tierschutzgesetzes umgesetzt.

Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Raum mit 12 stündigem Hell-Dunkel-Zyklus bis zu Versuchsbeginn gehalten. In einem Standardkäfig wurden zwei Tiere auf Standardeinstreu für Labortiere gesetzt. Diese hatten beliebig Zugang zu Wasser und Standardfutter, welches von der Firma Altromin (Lage, Deutschland) bezogen wurde.

Vor Beginn der Versuche oder Behandlungen wurde den Tieren nach Lieferung eine Eingewöhnungsphase gewährt.

#### **3.2 Induktion der Leberfibrose an zwei verschiedenen Fibrosemodellen - Gallengangligatur (BDL=bile duct ligation) und Thioacetamid-Behandlung (TAA)**

Neben den zwei Tiermodellen zur Induktion der Leberzirrhose erfolgte die Auswertung mit gesunden Tieren der Kontrollgruppe = sham.

Für alle Tierversuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet.

##### **3.2.1 Modell Gallengangsligatur = Bile duct ligation (BDL)**

Ratten mit dem Gewicht von 150-200 g wurden für diesen Versuchsaufbau verwendet. Am 4. Tag nach Akklimatisation der Tiere im Tierstall der Medizinischen Klinik I und II des Klinikum Großhadern wurde eine Gallengangsligatur zur Induktion einer cholestatischen Leberzirrhose durchgeführt.

Zu Beginn wurde das Tier mit 1:3 verdünnten steril filtierten Natriumpentobarbital

50mg/kg KG (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal narkotisiert. Das OP-Feld wurde gründlich mit 70% Alkohol sterilisiert. Nach circa 30 minütiger Einwirkungszeit des Narkotikums wurde das Abdomen der SD-Ratte rasiert und auf dem OP-Tisch fixiert. Anschließend wurde ein Schaumstoffkeil unter die Brustwirbelsäule gelegt, dies führte zu einer Überstreckung des Rückens und damit zu einem optimalen OP-Zugang. Nach Lagerung des Versuchstiers wurde das Abdomen mit Povidon-Iod-Lösung (Braunol, Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Nach 2 minütiger Einwirkungszeit wurde das Versuchstier mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt. Der Zugang erfolgte über eine mediane Laparotomie. Anschließend wurde der Gallengang präpariert und mit nichtresorbierbaren Propylenfäden der Stärke 3.0 (Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) zweifach ligiert und durchtrennt. Der Musculus rectus abdominis sowie die Haut wurden mittels Einzelkopfnähten mit Propylenfäden der Stärke 3.0 (Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die SD-Ratte wurde für 24 Stunden nach der Operation in einem Einzelkäfig gehalten und nach vollständiger Regeneration des chirurgischen Eingriffs mit einem Tier gleicher Charge in einen Käfig gesetzt. Es erfolgte dreimal wöchentlich die Substitution von Vitamin K mittels Injektion von 0,04ml Konakion (Roche, Deutschland) subkutan zur Minimierung des Blutungsrisikos bei cholestatischer Leberzirrhose. Das Trinkwasser wurde alle drei Tage gewechselt. Die Versuchstiere dieses Modells gingen wie im Folgenden beschrieben vier Wochen nach Gallengangsligatur entweder in den *in vivo* Versuch oder in die isolierte Leberperfusion.

### **3.2.2 Modell Thioacetamid Behandlung = TAA**

Als weiteres Modell zur Induktion einer Leberzirrhose wurde die Behandlung mit Thioacetamid (TAA) im Trinkwasser durchgeführt. Hierfür wurden etwas schwerere Tiere mit einem Gewicht von 200-250g ausgewählt, diese tolerierten die Applikation von TAA besser als leichtere Tiere.

Nach einer Eingewöhnungsphase von sieben Tagen erfolgte die Gabe von TAA über das Trinkwasser. Hierfür wurde initial eine Konzentration von 0,03% TAA gewählt. Das Wasser wurde alle zwei Tage gewechselt. Ab der dritten Woche erfolgte die TAA-Applikation gewichtsabhängig. Bei Gewichtszunahme oder -Abnahme um +/- 25g wurde die TAA-Konzentration um 0,015% gesteigert oder reduziert (Wu and Norton 1996; Laleman, Vander Elst et al. 2006). Um eine höhere Aufnahme des Thioacetamids zu erzielen, wurden zu dem TAA-Gemisch einige Tropfen Natriumcyclamat hinzugefügt. Die Thioacetamid-Applikation erfolgte 18 Wochen lang (n=9), anschließend gingen die Tiere in den *in vivo* Versuch.

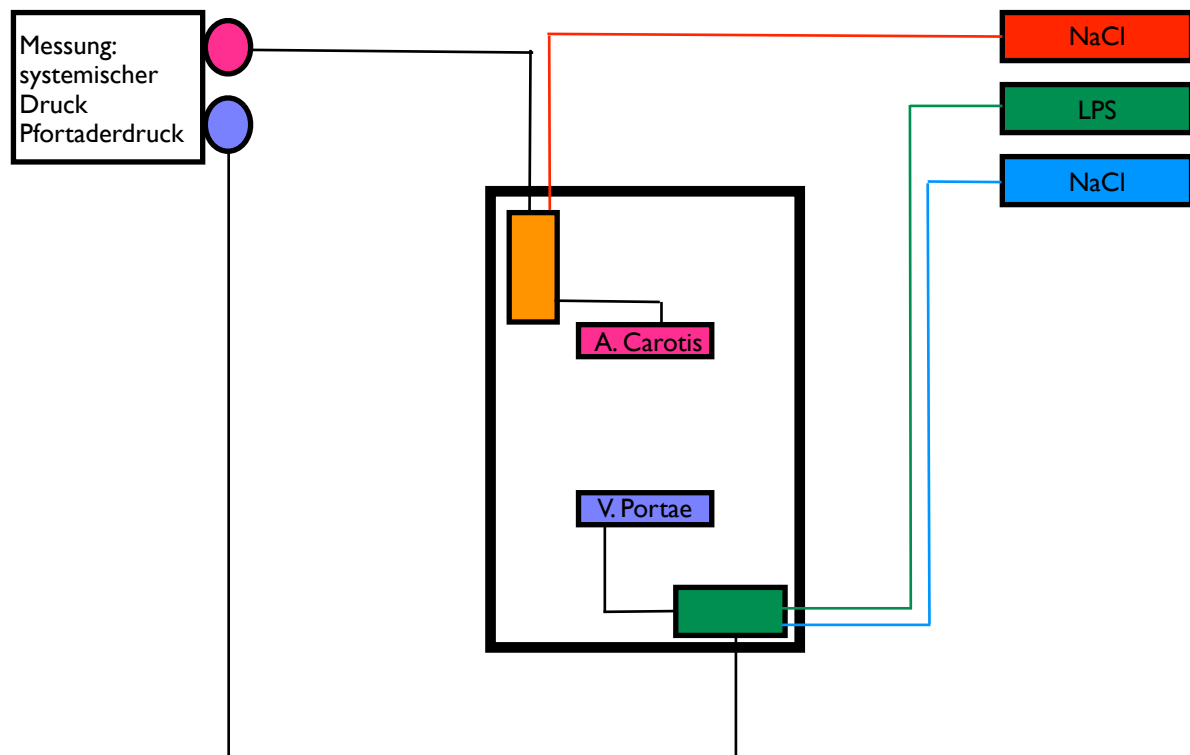
### **3.2.3 Histologie der Leberzirrhose**

Lebergewebeproben der Versuchsreihe sham, BDL und TAA wurden nach den Versuchen entnommen und in vierprozentigem, gepuffertem Formalin fixiert. Die Dehydrierung der Gewebeproben erfolgte gemäß Standard-Methoden mittels Ethanol. Anschließend wurden diese in Paraffin gebettet. 4µm dicke Gewebescheiben wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) und Elastica van Gieson (EvG) gefärbt und lichtmikroskopisch auf zirrhotypische Veränderungen untersucht.

### 3.3 *in vivo* Versuche an der SD-Ratte aus dem Modell BDL und TAA

Die *in vivo* Versuche wurden wie in der Arbeitsgruppe Van de Casteele et al. und unserer Arbeitsgruppe Steib et al. beschrieben durchgeführt (Van de Casteele, Hosli et al. 1999; Steib, Gerbes et al. 2007).

Die *in vivo* Versuche wurden in allen Tiergruppen nach dem gleichen Versuchsaufbau (Abb.12) durchgeführt.



**Abb.12)** Schematische Darstellung des *in vivo* Versuchs. Detaillierte Beschreibung siehe Text.

### Überblick der *in vivo* Tierversuche

	<b>BDL</b>	<b>TAA</b>
<i>in vivo</i> LPS (4mg/kg)	n=5	n=5
<i>in vivo</i> LPS (4mg/kg) + JWH-133 (10mg/kg KG)	n=5	n=5

Tbl. 1.) Darstellung der *in vivo* Versuche

#### 3.3.1 *in vivo* Versuche an der SD-Ratte mit Lipopolysaccharid

Je nach Versuchsgruppe wurde die *in vivo* Messung vier Wochen nach Gallengangsligatur (BDL, n=5) und nach 18 Wochen Thioacetamid Behandlung (TAA, n=5) durchgeführt. Vor Beginn des Versuchs wurde das Körpergewicht der Ratte bestimmt. Die Narkose der Tiere erfolgte wie oben beschrieben mit einer intraperitonealen Natriumpentobarbital-Injektion. Bei kompletter Analgesie wurde das Tier auf einer Operationsplatte in Rückenlage fixiert. Anschließend wurde die linke Arteria carotis communis über ca. 2,5 cm freigelegt und zwei Ligaturen vorgelegt. Um eine Kanülierung durchführen zu können, wurden zwei Gefäßclips kranial und kaudal der freigelegten Arteria carotis communis gesetzt. Im Anschluss wurde das Gefäß zwischen den beiden Gefäßklemmen mit einer Mikroschere eingeschnitten und ein 22 Gauge Teflon-Katheter eingeführt. Dieser wurde mit den vorgelegten Ligaturen befestigt. Die kaudale Gefäßklemme wurde entfernt. Eine an den Katheter angeschlossene Infusionspumpe perfundierte die A. communis mit NaCl 0,9% in einer Flussrate von 12 ml/h. Der Katheter war über einen Druckabnehmer an einen Monitor (Sirecust 404 von Siemens, Deutschland und Transducer Gabarith von Becton Dickinson, Singapur) angeschlossen. Über diesen Monitor erfolgte die kontinuierliche Darstellung des arteriellen Drucks sowie der Herzfrequenz.

Nach Sicherstellung stabiler Kreislaufverhältnissen folgten eine mediane Laparotomie und die Darstellung der Leberpforten. Die Pfortader wurde aufgesucht

und mit einem 23 Gauge Teflon-Katheter kanüliert. Der Katheter wurde an einen weiteren Druckabnehmer angeschlossen.

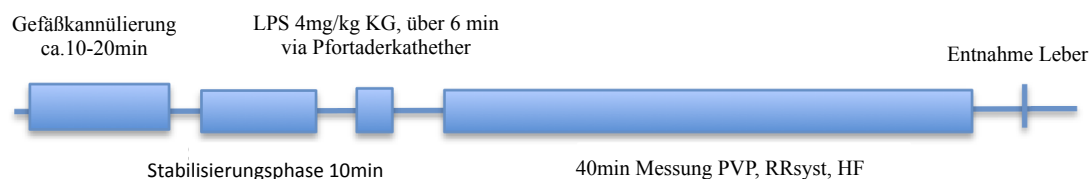
Für den Zeitraum einer Stunde wurden alle 2 Minuten die Herzfrequenz, der systemisch arterielle Druck, sowie der portale Druck gemessen.

Nach einer 10 minütigen Stabilisierungsphase erfolgte die Applikation von Lipopolysaccharid (LPS von *Escherichia coli* 026:B6, Sigma Aldrich, Deutschland), welches in 0,9% NaCl gelöst wurde.

Das Lipopolysaccharid wurde innerhalb von 6 Minuten in einer Konzentration von 4mg/kg Körpergewicht in einer Geschwindigkeit von 100µl/Minute über den portalvenösen Katheter verabreicht.

Im Anschluss fand eine 45 minütige Beobachtungsphase statt, in der weiterhin zweiminütig der portale Druck, sowie Herzfrequenz und der arterielle Druck gemessen wurden.

Am Ende des Versuchs wurde die Leber des Versuchstiers entnommen und teilweise bei -80° C konserviert und in Formalin asserviert. Anschließend erfolgten die Durchführung weiterer Messungen und die Anfertigung histologischer Schnittbilder.

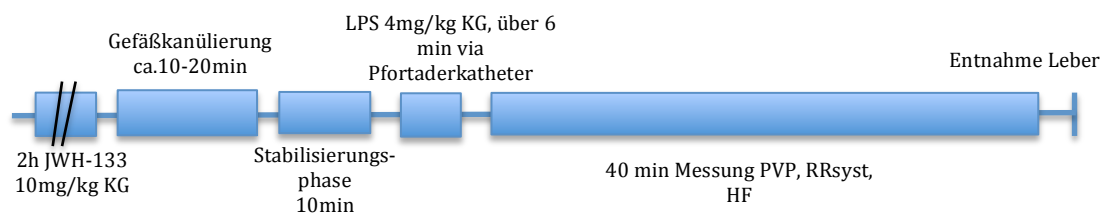


**Abb.13) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs *in vivo* am Modell TAA und BDL. Erklärung im Text**



### 3.3.2 *in vivo* Versuche an der SD-Ratte mit JWH-133 und LPS

Tiere (n=9), welche für die Cannabinoid-Behandlung verwendet wurden, erhielten 2 Stunden vor dem *in vivo* Versuch eine intraperitoneale Injektion mit dem CB<sub>2</sub>-Agonisten JWH-133 in einer Konzentration von 10mg/kg Körpergewicht. Alle weiteren Schritte erfolgten gemäß dem Versuchsschema der *in vivo* Versuche ohne CB<sub>2</sub>-Agonisten. Auch diese Lebern wurden nach Ende des *in vivo* Versuchs in Formalin fixiert und bei -80°C asserviert.



**Abb.14) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs *in vivo* mit Vorbehandlung JWH-133 am Modell TAA und BDL. Erklärung im Text.**

### 3.4 isolierte Leberperfusion an der SD-Ratte aus der Gruppe BDL

#### Überblick der *in situ* Tierversuche

	<b>BDL</b>
Isolierte Perfusion Zymosan A (150 µg/ml)	n=5
Isolierte Perfusion Zymosan A (150 µg/ml) + JWH-133 (10mg/kg)	n=5
Isolierte Perfusion Zymosan A (150 µg/ml) + ZnPP IX (1µM)	n=4

Tbl.2) Darstellung der *in situ* Versuche

Die Rattenleber-Perfusionen wurden nach einem standardisierten Verfahren, wie von Bilzer et al. 1999 beschrieben, durchgeführt (Bilzer, Jaeschke et al. 1999): Männliche Sprague-Dawley Ratten aus der Versuchsgruppe BDL wurden 4 Wochen nach Gallengangsligatur in den Versuch der isolierten Perfusion genommen (n= 14).

Zu Beginn wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Natriumpentobarbital Injektion (Narcoren 50mg/kg KG) anästhesiert. Nach Prüfung auf vollständige Narkose, wurde das Tier in Rückenlage auf eine Operationsplatte fixiert. Es folgte die Freilegung der V. femoralis in der Leiste und eine Injektion mit 250 IU Heparin. Im Anschluss wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt und die V. portae und V. cava inferior aufgesucht. Bei noch bestehendem Blutkreislauf wurden um die Pfortader zwei Ligaturen vorgelegt, sowie eine Ligatur um die Vena cava inferior kranial der V. renalis. Die V. portae wurde inzidiert und mit einem Polyethylen-Katheter der Größe 14 Gauge kanüliert. Die Pfortaderligaturen wurden festgezogen, um den Katheter in der Pfortader zu stabilisieren. Es erfolgte die umgehende Perfusion mit Hämoglobin- und Albumin- freiem Krebs-Henseleit Puffer (pH 7,4, 37°C) mit einem Fluss von ca. 3,5 ml/min x g Leber. Um zu hohe Perfusionsdrücke und damit verbundene Leberschäden zu vermeiden, wurde die Vena cava inferior oberhalb der Nierengefäße durchtrennt. Hierüber konnte das Perfusat den Kreislauf verlassen.

In den weiteren Schritten wurde eine Thorakotomie mit Eröffnung des rechten Atriums vorgenommen. Über den rechten Vorhof wurde ein Katheter in die V. cava inferior auf Höhe der Vv. hepaticae vorgeschoben. Die Ligatur um die V.cava kranial der Nierenvene wurde zugezogen. Damit wurde das komplette venöse Perfusat über den Katheter im rechten Atrium abgeleitet.

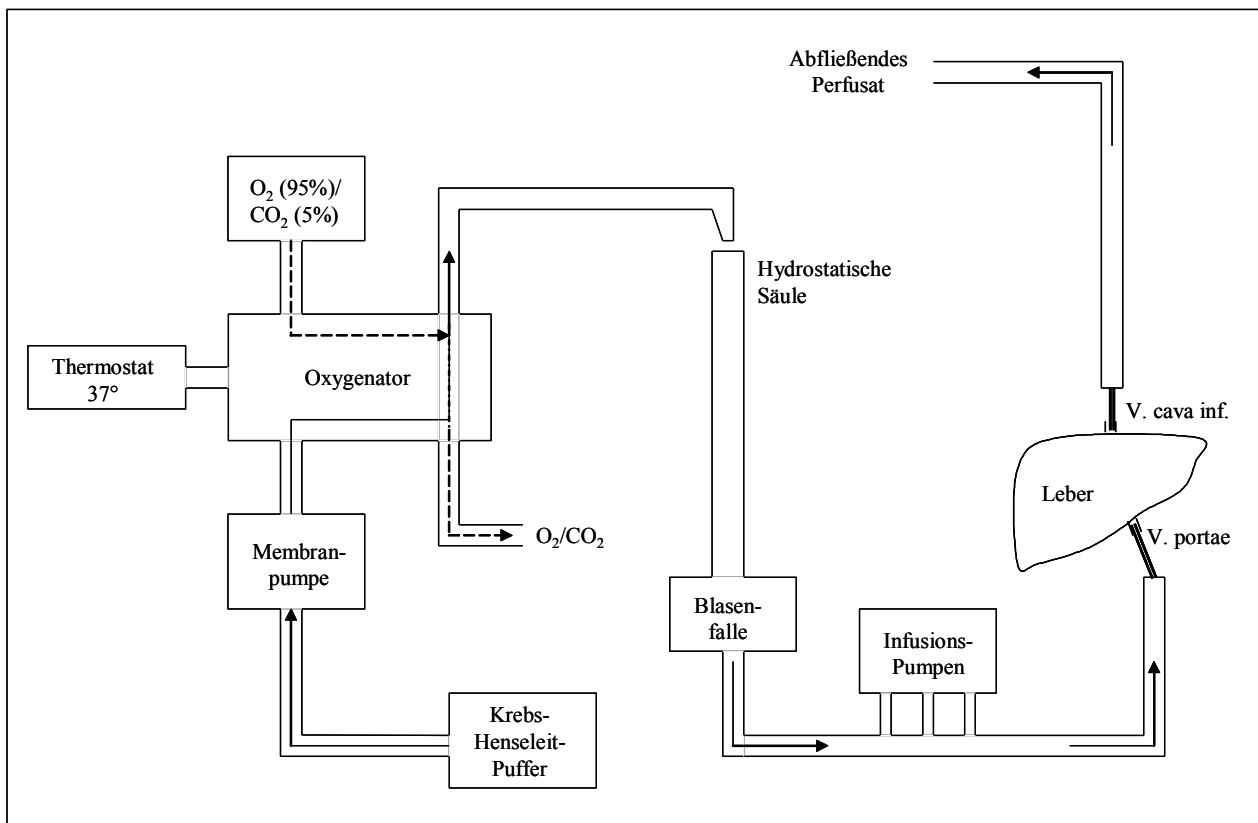
Zur Bestimmung der Galleproduktion wurde der Ductus choledochus mit einem Polyethylen-Katheter (Länge 5 cm, Innendurchmesser 0,4mm, totales Innenvolumen 6µl) kanüliert.

Das Perfusat wurde über einen Schlauchoxygenator mit Carbogen (O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5%) begast. Der Oxygenator bestand aus einem 15 m langen Silikonschlauch (Wandstärke 0,2mm, Innendurchmesser 2mm), welcher um einen beheizten Aluminiumblock gewickelt war (Steib, Gerbes et al. 2007). Über diesen wurde die Krebs-Henseleit-Lösung auf eine Temperatur von konstant 37°C erwärmt. Die Infusionspumpe beförderte das Perfusat mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 30-33 ml/min über eine Blasenfalle in die Leber. Um Luftembolien in der Leber zu

verhindern, wurde das Perfusat vor Eintritt in die Leber über eine Blasenfalle gepumpt, sodass keine Luftblasen in der Lösung enthalten waren.

Der Pfortaderkatheter war mit einer hydrostatischen Säule verbunden. Über diesen wurde der portale Druck in cmH<sub>2</sub>O kontinuierlich gemessen. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 15 schematisch dargestellt.

Perfusat- und Galleproben wurden intermittierend in Eppendorf-Cups gesammelt und in einem Eisbad während der Verlaufszeit aufbewahrt. Am Ende der Perfusion wurde die Leber explantiert. Das Feuchtgewicht wurde bestimmt und die Leber bei -80°C asserviert.



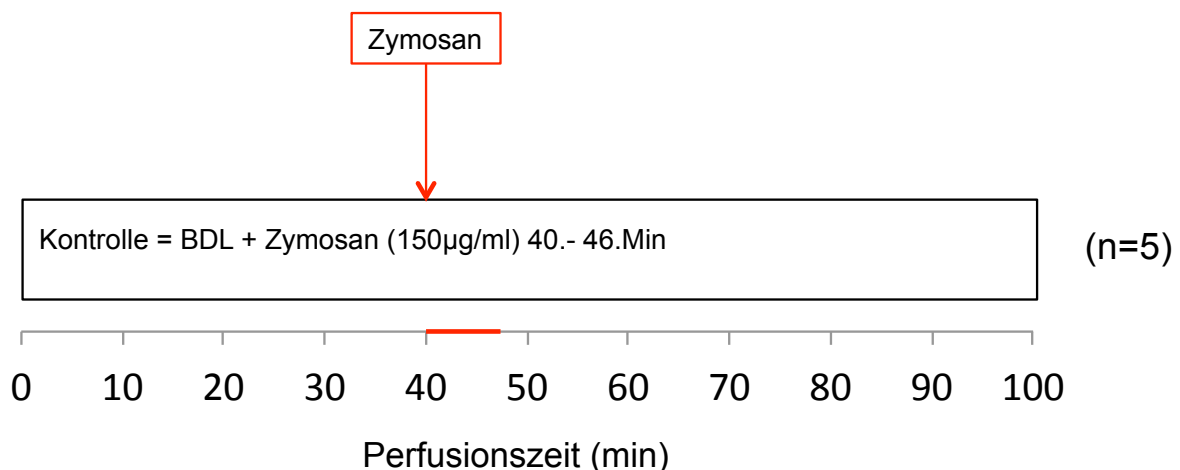
**Abb.15) Schematische Darstellung des Modells der perfundierten Rattenleber.**

Beschreibung im Text.

### 3.4.1 Aktivierung der Kupfferzellen mittels Zymosan in der isolierten Leberperfusion

Zur Aktivierung der Kupfferzellen wurde Zymosan A, ein Hefezellwandpartikel, verwendet. Vornehmlich wird durch Zymosan A an den Kupfferzellen der TLR-Rezeptor 2 und 6 aktiviert (Dufour and Clavien 2010). Die alleinige Applikation von Zymosan galt als Kontrolle zu den Perfusionen mit JWH-133 Vorbehandlung und ZnPP IX Infusion. Der Versuchsablauf wurde wie folgt durchgeführt:

Nach Kanülierung der Pfortader und einer Stabilisierungsphase von 20 Minuten erfolgte die Zymosan A Infusion. Zymosan A wurde in dem Krebs-Henseleit-Puffer in einer Konzentration von 150 µg/ml gelöst. Die Leber wurde in der 40.-46. Minute mit der Zymosan A Lösung über die Pfortader perfundiert (n=5). Über die komplette Versuchslaufzeit wurde der Perfusionsdruck gemessen.

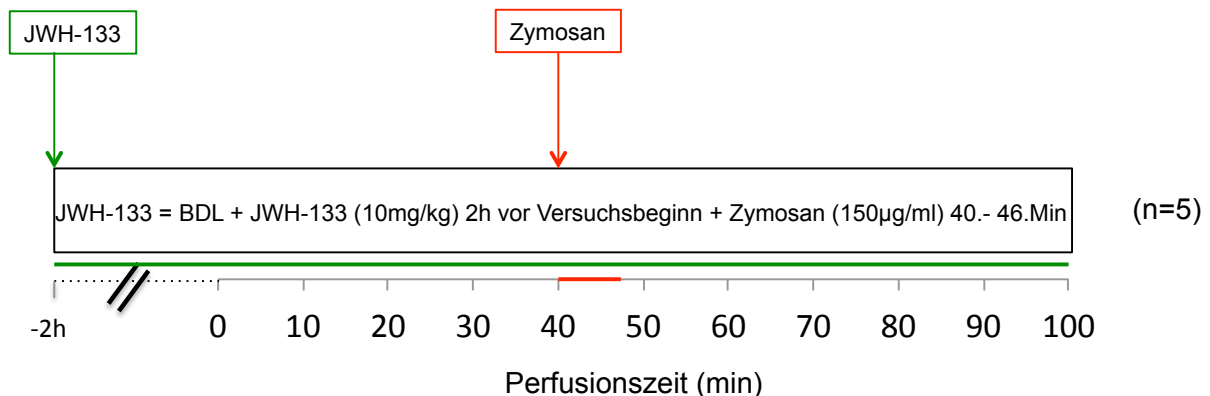


**Abb.16) Versuchsprotokoll zur Aktivierung der Kupfferzelle in der zirrhotischen Rattenleber. Beschreibung siehe Text.**

### 3.4.2 isolierte Leberperfusion mit Zymosan und Vorbehandlung mit JWH-133

Um die Effekte von JWH-133 auf die portale Hypertension genauer untersuchen zu können, führten wir zusätzlich zu den *in vivo* Versuchen isolierte Leberperfusionsen an BDL Tieren durch. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurde der CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonist JWH-133 in einer Konzentration von 10mg/kg KG intraperitoneal injiziert.

Anschließend erfolgte wie oben beschrieben, die Darstellung und Kanülierung der Pfortader. Auch hier wurde wie in der Kontrollgruppe die Leber mit einer Zymosan A Lösung (150 µg/ml) in der 40.-46. Minute perfundiert. Über die komplette Versuchslaufzeit wurde der Perfusionsdruck gemessen.

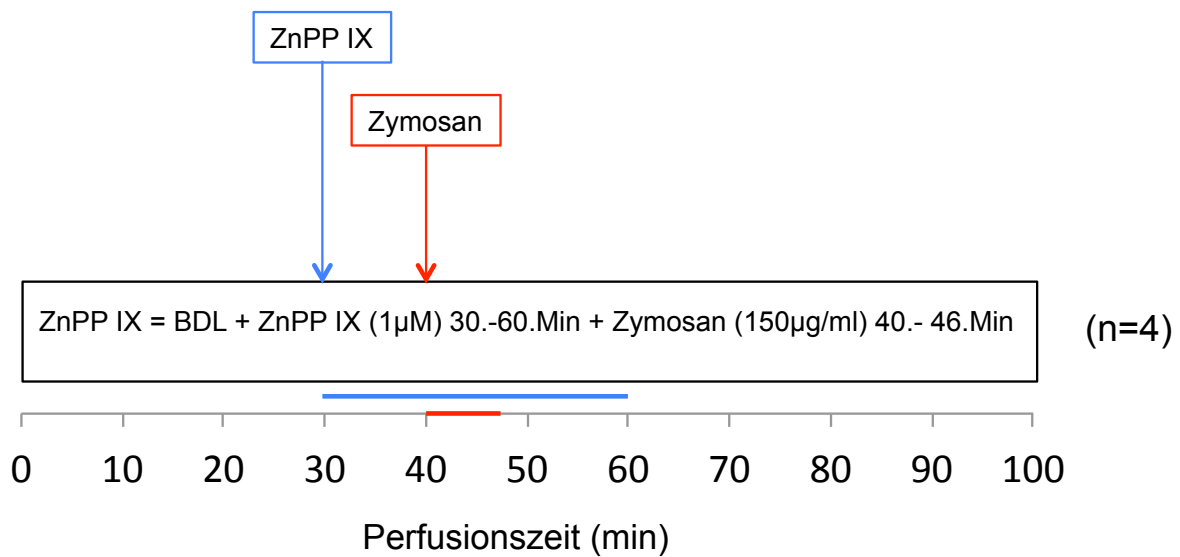


**Abb.17) Versuchsprotokoll: Vorbehandlung mittels JWH-133 und Stimulation der Kupferzellen mittels Zymosan A in der zirrhotischen Rattenleber am Modell der isolierten Perfusion. Beschreibung siehe im Text.**

### 3.4.3 isolierte Leberperfusion mit Zymosan und Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX

Aufgrund der protektiven Wirkung der HO-1 in der zirrhotischen Rattenleber wurde in diesen Versuchen die Auswirkung der Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX auf den portalen Perfusionsdruck untersucht (n=4).

Der Hemmstoff ZnPP IX (ZnPP IX = Zink Protoporphyrin neun, Inhibitor der HO-1) wurde in DMSO in einer Konzentration von 1 µM gelöst. Die Applikation von ZnPP IX erfolgte zwischen der 30.-60. Minute. Die Kupferzellstimulation mit Zymosan A wurde wie in den oben genannten Versuchen in der 40.-46. Minute durchgeführt. Über die komplette Versuchslaufzeit wurde der Perfusionsdruck gemessen.



**Abb.18) Versuchsprotokoll zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der HO-1 durch ihre Hemmung mittels ZnPP IX. Beschreibung siehe Text.**

### **3.5 Western Blot Analyse zur Darstellung der Proteinexpression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors und der HO-1 Expression nach Stimulation mit JWH-133 aus den Leberlysaten der isolierten Perfusion am Modell BDL**

Um den Einfluss von JWH-133 auf den CB<sub>2</sub>-Rezeptor und auf die HO-1 genauer untersuchen zu können, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Proben wurden aus Leberlysaten der isolierten Perfusion gewonnen. Die Behandlungen mit und ohne JWH-133 wurden verglichen.

Die Western Blot Analysen erfolgten nach einem Standardverfahren. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese über ein Polyacrylamid-Gel und einem Puffer (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Identifizierung der Proteine erfolgte die Inkubation mit einem primären Antikörper (Anti-HO-1, Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA; Anti-CB<sub>2</sub> Rezeptor, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Es folgte eine weitere Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten sekundärem Antikörper (für HO-1: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA; für Anti-CB<sub>2</sub> Rezeptor: GE Healthcare, München, Deutschland). Im Anschluss wurden die verschiedenen Banden mit einem Chemilumineszenz Kit optisch dargestellt (ECL

Plus, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Kontrolle erfolgte mit einer  $\beta$ -Aktin Probe, diese wurde mit einem anti- $\beta$ -Aktin Antikörper (Millipore, Billerica, USA) versehen.

### **3.6 Messung der Thromboxan B<sub>2</sub> Produktion mittels ELISA nach Stimulation mit Zymosan oder Zymosan + ZnPP IX**

Die Thromboxan A<sub>2</sub> Ausschüttung ist eine Antwort auf die Kupfferzellaktivierung mit Zymosan, einem bakteriellen Bestandteil. Thromboxan A<sub>2</sub> zerfällt nach kurzer Zeit in Thromboxan B<sub>2</sub>, eine stabile inaktive Form des Thromboxan A<sub>2</sub>. Dieser stabile Metabolit kann mittels Enzyme-linked-Immunosorbent-Analysis (ELISA) gemessen werden.

Im Versuch der isolierten Leberperfusion wurden Lysatproben zu bestimmten Zeitpunkten des Versuchs gesammelt (20., 30., 40., 44., 46., 50., 55., 60., 70., 80., 90. und 100. Versuchsminute). Diese Proben wurden mittels ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) auf Thromboxan B<sub>2</sub> untersucht.

Des Weiteren wurde bei *in vitro* Versuchen die Thromboxan B<sub>2</sub> Produktion von isolierten Kupfferzellen im Nährmedium gemessen. Nach einer Kupfferzellisolation (siehe 3.7) wurden die Zellen +/- JWH-133 - Vorbehandlung mit Zymosan oder LPS stimuliert. Der stabile Metabolit des Thromboxan A<sub>2</sub> wurde im Kupfferzellmedium mittels ELISA (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) ausgewertet.

### **3.7 Kupfferzellisolation aus gesunden SD-Rattenlebern**

Die Kupfferzellisolation aus gesunden SD-Rattenlebern wurde in abgewandelter Form nach den Methoden der Arbeitsgruppe Alabraba, EB. et al. durchgeführt (Alabraba, Curbishley et al. 2007).

Für jede Kupfferzellisolation wurden jeweils vier gesunde Sprague Dawley Ratten mit dem Gewicht von 180g ausgewählt. Nach intraperitonealer Narkoseeinleitung der SD-Ratte mit 100-200 $\mu$ l unverdünntem Pentobarbital (Nacoren) folgte eine Hepatektomie: mittels medianer Längslaparotomie von ca. 5cm erfolgte die Eröffnung des Bauchraums, anschließend wurde die Pfortader aufgesucht und

kanüliert. Die Leber wurde mit Kulturmedium (RPMI 1640, PAA, Cölbe, Deutschland) und Heparin blutleer gespült und daraufhin entnommen. Nach Säuberung mit NaCl und 0,75% Ethanol wurde die Leber in einem Becherglas mit Medium (RPMI 1640, PAA, Cölbe, Deutschland) aufbewahrt. Die weiteren Schritte der Zellisolation erfolgten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Die Rattenlebern wurden in eine Petrischale gegeben und mit einem Skalpell in kleine 5-10mm dicke Stücke geschnitten, bis sich eine breiige Masse gebildet hatte. Es folgte eine Waschung mit PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma Aldrich, Deutschland). Anschließend erfolgte eine Lysierung der klein geschnittenen Lebermasse. Hierzu wurde eine Lösung angesetzt bestehend aus:

- a.) 20 ml Pronase E (7433 Merck, Deutschland), welche steril filtriert und in GBSS (Grey's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich, Deutschland) unter lichtgeschützten Bedingungen gelöst wurde
- b.) die gelöste Pronase wurde dann mit 50ml GBSS und 500µg DNase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) versetzt.

Als weiterer Schritt wurde nun die Lebermasse mit der angesetzten Lösung lichtgeschützt in einem Brutschrank bei 37 Grad Celsius unter ständigem Rühren 20 Minuten inkubiert.

Anschließend folgte eine Filtration der Lebermasse in einem 80µm Netz (PA-17N-80 Mesh, John Staniar & Co., Manchester, United Kingdom). Der Überstand wurde mit GBSS und DNase in einem Stomacher Bag (Seward Standard Bags, Seward, Worthing, United Kingdom) überführt und anschließend wurde dieses Gemisch in einem Stomacher (Seward Stomacher® 400 Circulator, Seward, Worthing, United Kingdom) weiter zerkleinert. Dieser Prozess galt der weiteren Auflösung von Zell-Zellverbindungen. Die weiter lysierte Suspension wurde ein zweites Mal filtriert, nun allerdings in einem kleineren Filter mit Poren der Größe 60µm (PA- 25N- 63 Mesh, John Staniar & Co., Manchester, United Kingdom). Nach Aufteilung der Lösung in 50ml Falconröhrchen (polystyrene Tubes, BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) à 20ml wurde eine Waschung mit 0,9% NaCl und DNase vorgenommen. Im weiteren Verlauf wurde die Lösung bei 4 Grad Celsius 20 Minuten bei 300g ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ ) mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde mit 20ml GBSS resuspendiert. Für die weitere Isolation der Kupferzellen wurde eine spezielle Lösung, Nycodenzlösung (Axxis Shield,



Rodelokka, Norwegen) benötigt. Diese Lösung ermöglicht durch Zentrifugieren eine Separation von vitalen Zellen und Zellfragmenten sowie toten Zellen. Die Herstellung der Nycodenzlösung wurde wie folgt durchgeführt: Zu Beginn wurde ein isotoner Puffer angesetzt bestehend aus 0.75% NaCl, 5 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 mM KCl und 0.3 mM CaNa<sub>2</sub> EDTA. 50ml von diesem Puffer wurde auf 50°C unter ständigem Rühren erhitzt, anschließend wurde 27,6g des Nycodenzpulvers langsam hinzugefügt. Nachdem sich das Nycodenzpulver vollständig in der Stocklösung aufgelöst hatte, wurde 50ml bidestilliertes Wasser hinzugefügt. Bei Raumtemperatur kühlte die Lösung ab. Um eine erhöhte Ausbeute der Kupfferzellen zu erlangen, wurde eine 17,2 % isotone Nycodenzlösung benötigt. Diese wurde durch Hinzufügen von 60ml GBSS hergestellt.

Für die Auftrennung der Leberzellmasse wurde die abgekühlte Nycodenzlösung steril filtriert. Nach Aufteilung der Nycodenzlösung in 15ml Portionen in 50ml Falconröhrchen, beschichtet mit Kollagen, wurde die Lösung bestehend aus GBSS und lysiertem Lebergewebe auf die Nycodenzlösung geschichtet, es entstanden zwei Schichten: unten die klare Nycodenzlösung und oben die braungraue Leberzelllösung. Anschließend folgte eine Stufengradientenzentrifugation, das Gemisch wurde bei 600g 20 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Da die Nycodenzlösung einen flüssigen Filter darstellt, sammelte sich zwischen Leberzelllösung und Nycodenz eine Zwischenschicht mit Kupfferzellen. Zellfragmente oder Zellen anderer Art, wie Hepatozyten, Endothelzellen etc. waren als Niederschlag am Boden des Falconröhrchen zu erkennen. Ca. 20ml von der Zwischenschicht wurden pipettiert und in ein 50ml Falconröhrchen überführt.

Es folgten Waschungen der Zelllösungen. Die bis zur Hälfte gefüllten Falconröhrchen wurden mit 0,9% NaCl und DNase resuspendiert. In einem folgenden Schritt wurde die Suspension 5 Minuten bei 2000g zentrifugiert. Dieses Procedere wurde wiederholt.

Im weiteren Verlauf wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 5ml Medium resuspendiert. Das Medium wurde mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (Sigma Aldrich, Deutschland), sowie FCS (Fetal Calf Serum; PAA Cölbe, Deutschland) versetzt, so dass keine Bakterien während der Inkubation wachsen konnten.

Die gewonnenen Kupfferzellen wurden in Petrischalen (BD bioscience, Heidelberg, Deutschland) mit dem Durchmesser von 10cm in 4,5ml Medium und in 6 well (BD

bioscience, Heidelberg, Deutschland) oder 8 well (ibidi, Martinsried, Deutschland) mit 800µl oder 200µl Medium kultiviert. Eine Stunde nach Aussaat der Zellen fand der erste Mediumwechsel statt. Je nach Reinheit und Dichte der Zellen wurden diese ein weiteres Mal mit 0,9% NaCl abgewaschen oder nur das Medium gewechselt. Ein Tag nach Zellisolation fand ein Mediumwechsel statt, in der darauffolgenden Zeit nur noch alle zwei Tage. Die Kupfferzellen wurde in einem Brutschrank bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert.

### Kupfferzellstimulation

Einige Tage nach Isolation der Kupfferzellen und regelmäßigem Mediumwechsel wurde eine Kupfferzellstimulation mit LPS durchgeführt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Kupfferzellen auf Minus-Medium gesetzt, welches nicht mit fetalem Kalbserum (FCS) und Antibiotikum (Pen/Strep) versetzt war. Die Stimulation der Kupfferzellen wurde mit 3 mg/ml LPS oder mit 0,5 mg/ml Zymosan A eine Stunde vor Versuchsauswertung durchgeführt. In der Versuchsreihe JWH-133 wurde vor Stimulation mit LPS oder Zymosan eine 3 stündige Vorbehandlung mit dem CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten (JWH-133) in einer Konzentration von 5µM durchgeführt.

### **3.8 Konfokale Mikroskopie zur Bestimmung der CB<sub>2</sub> Rezeptordichte und der HO-1 Expression in den isolierten Kupfferzellen**

Mittels konfokaler Mikroskopie konnte die Expression des CB<sub>2</sub> Rezeptors und von HO-1 in primär isolierten Kupfferzellen gesunder Tiere nachgewiesen werden. Die Zellen wurden wie bei den *in vivo* Versuchen und bei der isolierten Perfusion mit und ohne JWH-133 zwei Stunden vorbehandelt (5µM) und eine Stunde vor Versuchsbeginn mit LPS (3mg/ml) oder Zymosan A (0,5mg/ml) stimuliert. Zur Kontrolle wurde ebenso bei nativen Kupfferzellen (ohne Stimulation) die CB<sub>2</sub> Rezeptor- sowie die HO-1 Expression analysiert.

Die primär isolierten Kupfferzellen wurden mit 4% PFA fixiert, unspezifische Bindestellen mit einer 1%BSA-Lösung geblockt und anschließend mit PBS

gewaschen. Zum Nachweis des CB<sub>2</sub> Rezeptors und von HO-1 wurden die Zellen eine Stunde mit dem jeweiligem spezifischen Antikörper (anti-CB<sub>2</sub> Rezeptor-Antikörper, 3µg/ml, Abcam, Cambridge, UK; anti-HO-1-Antikörper, 5mg/ml, Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde der entsprechende fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper (2µg/ml, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 30 Minuten zugegeben. Im Anschluß wurden nicht gebundene Antikörper durch erneutes Waschen mit PBS entfernt.

Zum Nachweis der Reinheit der primär isolierten Zellkultur erfolgte die gleichzeitige Markierung der Zellen mit einem spezifischen Kupfferzell-Antikörper (anti-CD163-Antikörper, 5µg/ml Acris Antibodies, San Diego, USA). Dieser Antikörper wurde vorher mittels dem Lightning-Link™ Atto488 Kit (Innova Biosciences) fluoreszenzmarkiert.

Nach wiederholter Waschung der Zellen mit PBS wurden sie mit dem LSM510 Meta (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) konfokal mikroskopisch analysiert.

Zur Blocklösung:

1% BSA, 0.05% Tween20 in PBS

Zur Fixierlösung:

4% PFA in PBS

### **3.9 Western Blot Analyse der HO-1 Expression isolierter Kupfferzellen gesunder SD-Ratten vor und nach Stimulation mit JWH-133**

Die HO-1 wird vor allem nach akuter oder chronischer Leberschädigung in Kupfferzellen exprimiert (Makino, Suematsu et al. 2001). Noch nicht untersucht wurde die HO-1 Expression vor und nach JWH-133 Stimulation. Wir führten daher Western Blot Analysen durch, um die Syntheseaktivität nach JWH-133 Stimulation verifizieren zu können.

Die Western Blot Analysen erfolgten nach einem Standardverfahren. Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese über ein Polyacrylamid-Gel und einem Puffer (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Identifizierung der Proteine erfolgte

die Inkubation mit einem primären Antikörper (Anti-HO-1, Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA). Eine weitere Inkubation wurde mit einem Peroxidase-konjugiertem Antikörper (für HO-1: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) durchgeführt. Im Anschluss wurden die verschiedenen Banden mit einem Chemilumineszenz-Kit optisch dargestellt (ECL Plus, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden). Als Kontrolle wurde eine  $\beta$ -Aktin Probe verwendet, diese wurde mit einem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper versehen (Millipore, Billerica, USA).

## 4. Materialien

### 4.1 Materialien für die in vivo und in situ Versuche

Aqua bi-dest.	Kerndl, Weißenfeld
Braunol (Povidon-Iod 7,5%)	Braun, Melsungen
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Calcium-dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat	Merck, Darmstadt
Carbogen (O <sub>2</sub> 95%, CO <sub>2</sub> 5%)	Linde, Pullach
Chlorwasserstoff	Merck, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Chemical Co., St.Louis
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin (Formaldehydlösung 4%)	Microcos, Garching
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Isopropanol (70%)	Apotheke Innenstadt, LMU München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Konakion	Roche, Mannheim
LPS ( <i>E.coli</i> 026:B6)	Sigma Chemical Co., St.Louis
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Narcoren (Natriumpentobarbital)	Merial, Hallbergmoos
Natriumchlorid (Lösung, 0,9%)	Braun, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat, reinst	Merck, Darmstadt
Stickstoff (N <sub>2</sub> , flüssig)	Linde, Pullach
Zymosan A	Sigma Chemical Co., St.Louis

#### Pufferlösung:

Krebs Henseleit:	NaCl	118mM
	KCl	4,8mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2mM
	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1,2mM
	NaHCO <sub>3</sub>	25mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,5mM

## 4.2 Rezeptoragonisten und Antagonisten

JWH-133

Tocris Bioscience, Bristol

ZnPP IX

Sigma Chemical Co., St.Louis

## 4.3 Materialien für den Western blot

β-Aktin

Millipore, Billerica

Acrylamid (30%)

Bio-RAD, Hercules

APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sigma Chemical Co., St.Louis

Blotting Grade Blocker, non-fat dry milk

Bio-RAD, Hercules

Bromphenolblau

Sigma Chemical Co., St.Louis

Chemiluminescent-Detection-Kit (ECL PLUS)

Amersham Pharmacia,  
Uppsala

Essigsäure (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>)

Roth, Karlsruhe

Glycerin

Merck, Darmstadt

Glycin

Merck, Darmstadt

2-Mercaptoethanol

Sigma Chemical Co., St.Louis

Methanol

Roth, Karlsruhe

Polysorbat-20 (Tween)

Promega, Madison

Primär-Antikörper

(anti-CB<sub>2</sub>)

Santa Cruz Biotechnology,  
Santa Cruz

(anti-HO-1)

Enzo Life Science, Framingdale

Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
Sekundärantikörper für HO-1 (Peroxidase-konjugiert)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz
Sekundärantikörper für CB <sub>2</sub> (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)	GE Healthcare, München
TEMED (Tetramethylethyldiamin (C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ))	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan + Salzsäure)	Roth, Karlsruhe

#### 4.4 Material für ELISA

Enzyme Immunoassay Kit Thromboxane B <sub>2</sub> , Catalog No. 900-002 (96 Well Kit)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
--	------------------------------------

#### 4.5 Materialien für die Kupfferzellisolation

6 well Platten	BD bioscience, Heidelberg
8 well Platten	Ibidi, Martinsried
10cm Petrischalen	BD bioscience, Heidelberg
80µm Mesh (PA-17N-80 Mesh)	John Staniar&Co., Manchester
60 µm Mesh (PA-25N-63 Mesh)	John Staniar&Co., Manchester
DNAse	Roche, Mannheim
FCS	PAA, Cölbe
GBSS	Sigma Chemical Co., St.Louis
Nycodenz	Axxis Shield, Rodelokka
PBS	Sigma Chemical Co., St.Louis
Pronase E 7433	Merck, Deutschland
RPMI 1640	PAA, Cölbe
Stomacher Bag	Seward, Worthing
Seward Stomacher® 400 Circulator	Seward, Worthing

Streptomycin/Penicillin

Sigma Chemical Co., St.Louis

Isotone Pufferlösung:

NaCl	0.75% (128mM)
Tris-HCl	5 mM
KCl	3 mM
CaNa <sub>2</sub> EDTA	0.3 mM

#### 4.6 Materialien für die konfokale Mikroskopie

0.05% Tween20

Sigma Aldrich, Deutschland

4% PFA

Roth, Deutschland

1%BSA-Lösung

Sigma Aldrich, Deutschland

anti-CD163-Antikörper

Acris Antibodies, San Diego

Lightning-Link™ Atto488 Kit

Innova Biosciences Cambridge

LSM510 Meta

Carl Zeiss Microscopy GmbH,  
Oberkochen

primärer Antikörper

anti-CB<sub>2</sub> Rezeptor-Antikörper

Abcam, Cambridge

anti-HO-1-Antikörper

Enzo Life Sciences,  
Farmingdale

sekundärer Antikörper

Life Technologies GmbH,  
Darmstadt



## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der Leberhistologie: Zirrhosemodelle

Um die Kriterien einer Zirrhose sicher zu stellen, wurden Teile der Tierlebern aus den Versuchsmodellen BDL, TAA und sham entnommen. Anschließend erfolgte eine Färbung der einzelnen Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin, sowie mit Elastica van Gieson. Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin wird routinemäßig im klinischen Alltag benutzt und soll vor allem anhand der Einzelfärbungen die Gewebestruktur der Leber zeigen. Mit der Elastica van Gieson Färbung lässt sich bevorzugt Bindegewebe und vor allem Kollagen darstellen. Ein Nebenkriterium der Zirrhosebildung stellt die intraabdominelle Bildung von Aszites dar. In beiden interventionellen Tiermodellen war die Bildung von Aszites im Rahmen einer Leberzirrhose zu verzeichnen.

Es konnte gezeigt werden, dass Tiere vier Wochen nach Gallengangsligatur (BDL) eine cholestatische Leberzirrhose ausbildeten (Abb.19b und d). Histologisch präsentierten sich die Periportalfelder hochgradig verbreitert. Es bestand eine starke Gallengangsproliferation in den Portalfeldern, begleitet von einer retikulären Fibrose (Abb.19 b und d).

Schnittbilder aus der Gruppe TAA zeigten nach 18 Wochen gewichtsabhängiger Behandlung eine hochgradige makronoduläre Zirrhose mit dicken Bindegewebssepten. Die physiologische Leberstruktur mit ihren Periportalfeldern und Zentralvenen war komplett aufgehoben (Abb. 20b, d)

Sham operierte Tiere wiesen eine physiologische Leberstruktur auf, es bestand kein Hinweis auf eine Fibrose oder Zirrhose (Abb.19a, c; 20a, c).

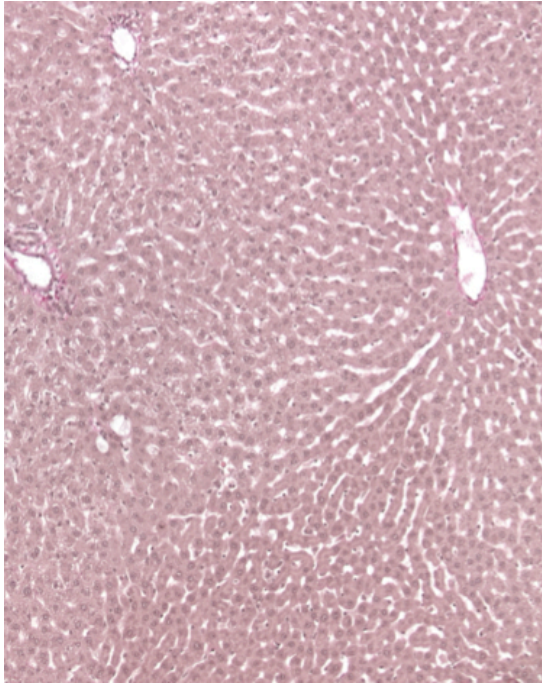


Abb.19a) EvG Färbung sham

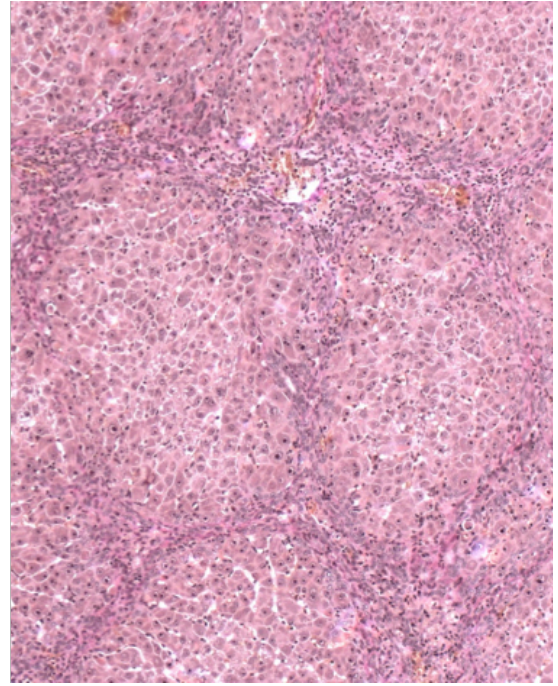


Abb.19b) EvG Färbung 4 Wochen nach BDL

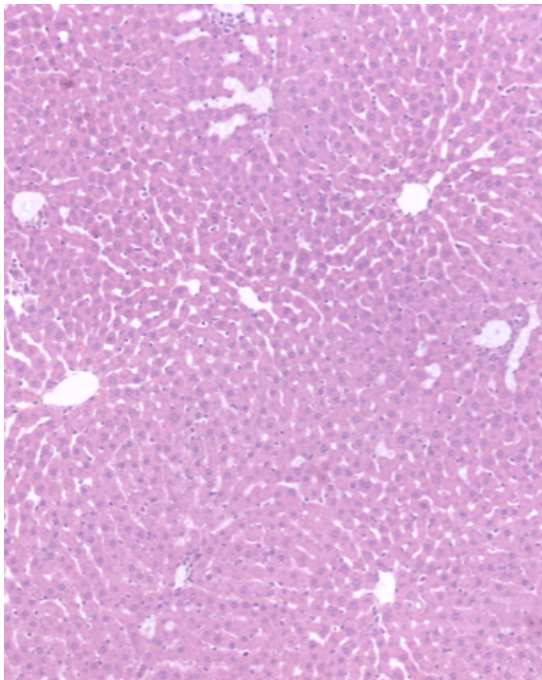


Abb.19 c) HE Färbung sham

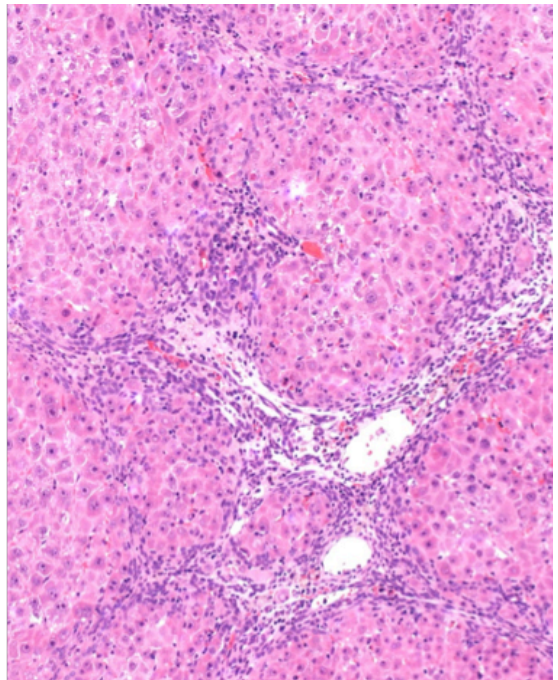


Abb.19d) HE Färbung 4 Wochen nach BDL

**Abb.19a-d) Vergleich von repräsentativen Histologien der gesunden Lebern (sham)**

**mit Lebern bei Z.n. Gallengangsligatur (BDL) in der EvG und HE**

**Färbung.** 28 Tage nach Gallengangsligatur (BDL) sind die Portalfelder aufgehoben (b und d). Es hat eine Vermehrung des Bindegewebes in Form einer perivenösen retikulären Fibrose stattgefunden. Des Weiteren sind Gallengangsproliferationen zu erkennen. Die Glissonschen Triaden sind durchsetzt von inflammatorischen Zellen.



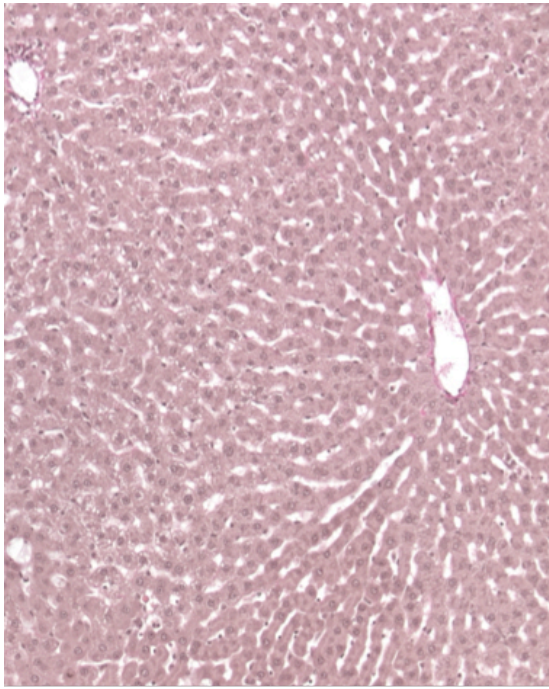


Abb.20a) EvG Färbung sham

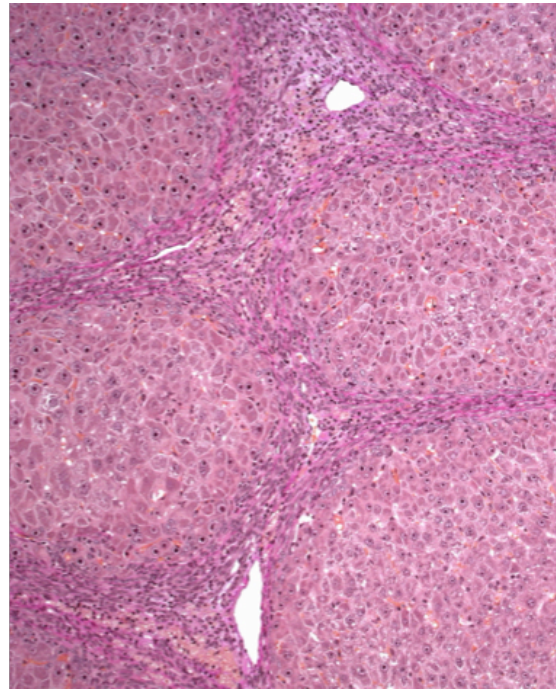


Abb. 20b) EvG Färbung TAA

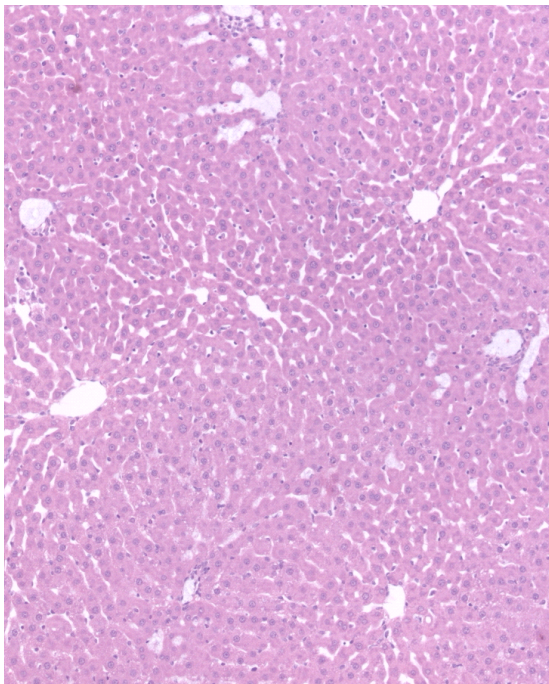


Abb. 20c) HE Färbung sham

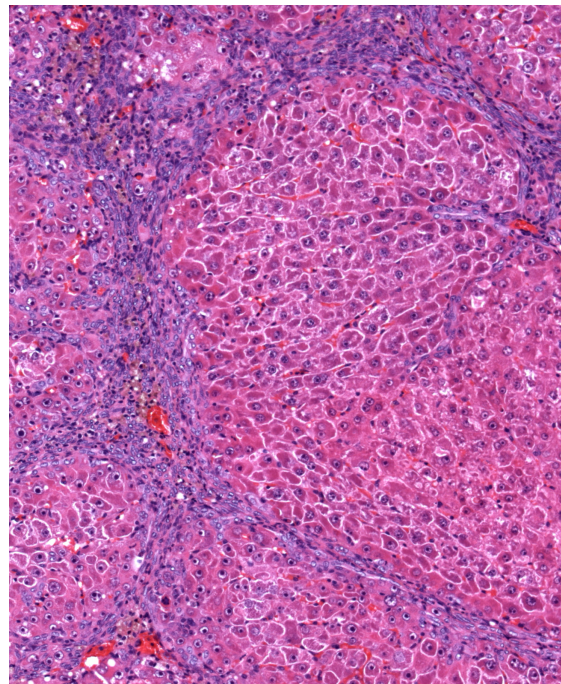


Abb. 20d) HE Färbung TAA

**Abb.20a-d) Vergleich von repräsentativen Histologien der gesunden Leber (sham) mit Lebern bei Z.n. Behandlung mit TAA in der EvG und HE Färbung.**

Die Tiere der Kontrollgruppe (sham; a und c) zeigen keinerlei Veränderung der Struktur des Leberparenchyms. Die Leber präsentiert sich mit ihren physiologischen Portalfeldern, mit ihren Zentralvenen, den Gallenkanalikuli, sowie den Glissonschen Trias. Das histologische Bild der Leber der mit TAA (c und d) vorbehandelten Tiere ist geprägt von fibrinösen Septen, Infiltration mit entzündlichen Zellen, sowie hepatozytären Nekrosen.

## **5.2 Portale Druckänderung im *in vivo* Versuch mit Vorbehandlung CB<sub>2</sub> - Rezeptor Agonisten (JWH-133) und anschließender LPS Stimulation am Modell BDL und TAA**

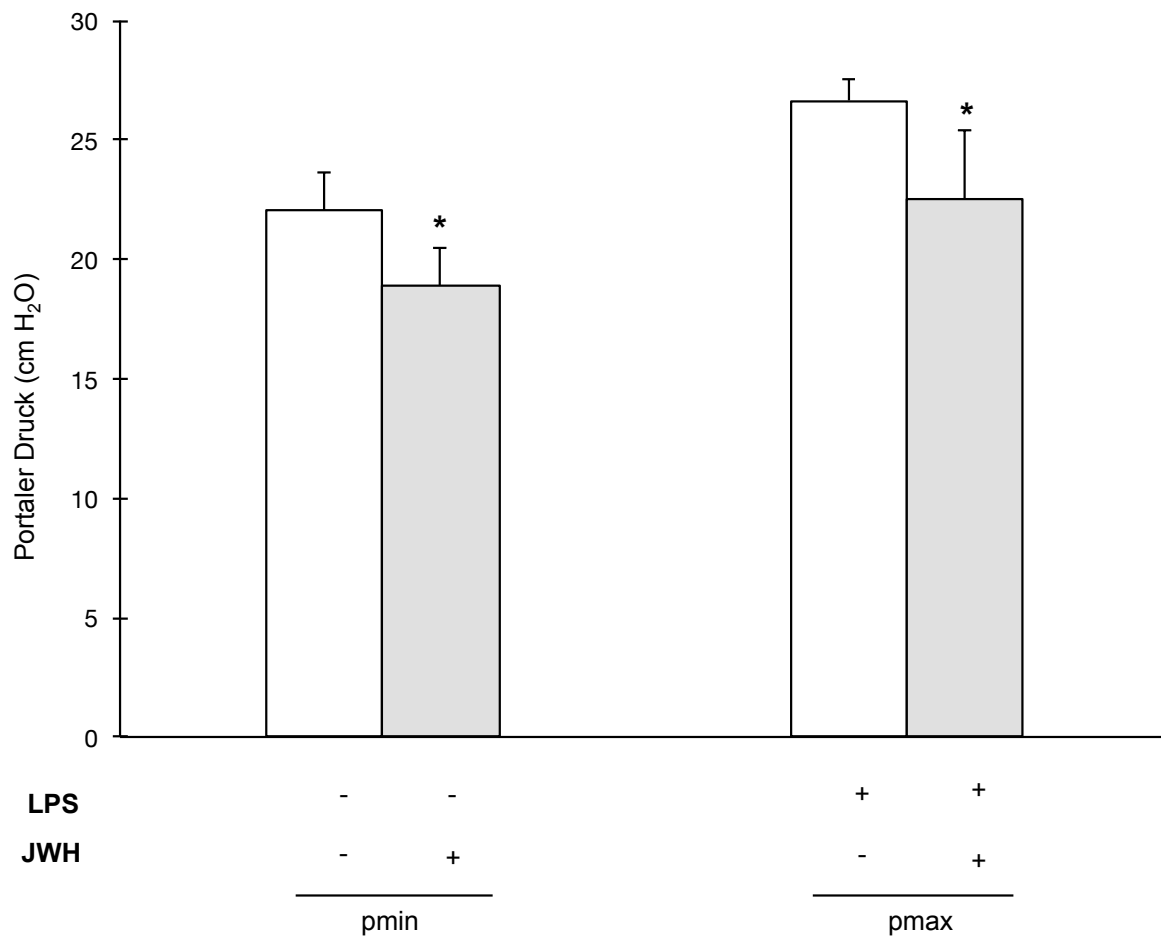
Die Vorbehandlung mit JWH-133 konnte in den *in vivo* Versuchen am Modell BDL und TAA den basalen und maximalen Pfortaderdruck senken. Diese Ergebnisse waren signifikant (\* $p < 0,05$ ).

### **5.2.1 basaler und maximaler Druck im Vergleich mit und ohne JWH-133 Vorbehandlung am Modell BDL**

Eine Randomisierung der Versuchstiere erfolgte auf die Gruppe JWH-133 (n=5) und Kontrollgruppe (n=5). Die Gruppe der JWH-133 vorbehandelten Tieren wurden 2 Stunden vor Versuchsbeginn der Cannabinoid-Rezeptor 2 Agonist JWH-133 in einer Dosierung von 10mg/kg KG intraperitoneal appliziert.

Die Vorbehandlung mit dem CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten reduzierte den basalen portalen Druck signifikant im Vergleich zu den Versuchen ohne CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten (JWH-133:  $18,9 \pm 1,62$  cm H<sub>2</sub>O vs. Kontrolle:  $22,03 \pm 1,56$  cm H<sub>2</sub>O; \* $p < 0,05$ ). Im weiteren Versuchsablauf wurde mittels Infusion von Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien (LPS E.coli 026:B6), eine Endotoxämie induziert. Dies bewirkt vermutlich die Aktivierung der Kupfferzellen über die Stimulation von TLR-4 Rezeptoren (Su 2002). In der Kontrollgruppe stieg der portale Druck nach LPS-Gabe stark an. Im Vergleich dazu konnte durch die Vorbehandlung von JWH-133 eine signifikante Reduzierung des maximalen portalen Drucks erzielt werden (mit JWH-133:  $22,53 \pm 2,86$  cm H<sub>2</sub>O vs. Kontrolle:  $26,65 \pm 0,88$  cm H<sub>2</sub>O; \* $p < 0,05$ ).

JWH-133 induzierte sowohl eine signifikante Reduktion des basalen als auch des maximalen portalen Drucks *in vivo* am Modell BDL (Abb.21).



**Abb.21) *in vivo* Messung des portalen Drucks mit und ohne JWH-133 Vorbehandlung 2**

**Stunden vor Versuchsbeginn am Modell BDL** (Angaben in MEAN ± SD).

Die Vorbehandlung mit JWH-133 (grauer Balken) reduzierte den basalen portalen Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken) signifikant (pmin mit JWH-133: 18,9±1,62 cm H<sub>2</sub>O vs. pmin Kontrolle: 22,03±1,56 cm H<sub>2</sub>O; \*p<0,05).

Nach Stimulation der Kupfferzellen mit Lipopolysaccharid (LPS von E.coli Bakterien 026:B6, 2mg/kg in 100µl/min über 6min) stieg der portale Druck in der Kontrollgruppe auf einen maximalen Wert von 26,65±0,88 cm H<sub>2</sub>O. Versuchstiere, die mit JWH-133 vorbehandelt wurden, hatten einen Pfortaderdruck nach LPS Stimulation von 22,53±2,86 cm H<sub>2</sub>O; \*p<0,05. Durch die Vorbehandlung mit JWH-133 konnte eine signifikante Reduktion des maximalen Pfortaderdrucks erreicht werden.

### **5.2.2 basaler und maximaler Druck im Vergleich mit und ohne JWH-133**

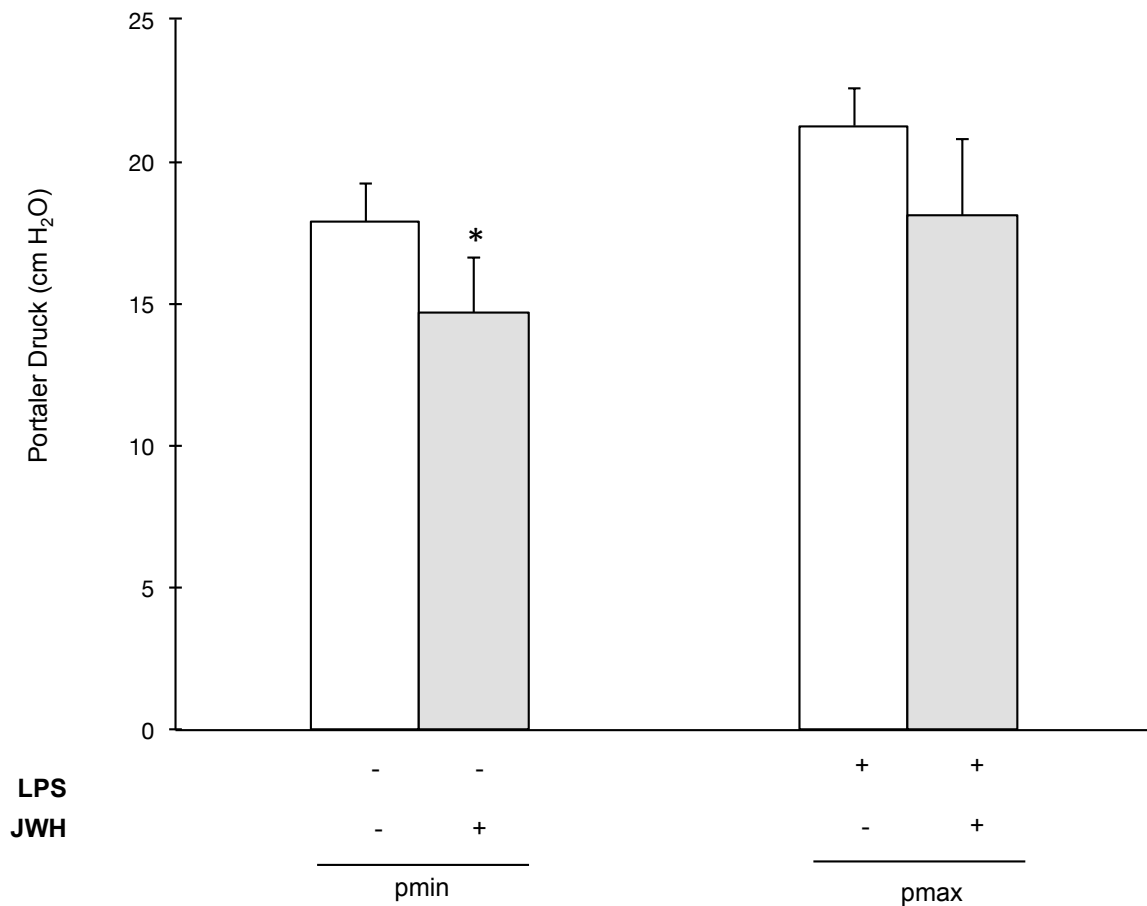
#### **Vorbehandlung am Modell TAA**

Am Modell der Thioacetamid Behandlung konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der Versuchsgruppe BDL verzeichnet werden.

Diese Tiere wurden 18 Wochen gewichtsadaptiert mit Thioacetamid im Trinkwasser behandelt. Wie oben beschrieben zeigte die Histologie eine ausgeprägte Leberzirrhose.

Genau wie im Modell BDL wurden die Versuchstiere randomisiert der JWH-133 – (n=5) und Kontrollgruppe (n=4) zugeteilt. Aufgrund einer Störung im Versuchsablauf bei einem Tier aus der Kontrollgruppe wurde dieses Tier aus der Wertung genommen.

In den *in vivo* Versuchen konnte durch die Vorbehandlung mit JWH-133 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Minderung des basalen portalen Drucks gemessen werden ( $14,68 \pm 1,96$  cm H<sub>2</sub>O versus  $17,85 \pm 1,4$  cm H<sub>2</sub>O \* $p < 0,05$ ). In der Kontrollgruppe erreichte die Kupfferzellaktivierung mittels LPS einen maximalen Druck von  $21,26 \pm 1,3$  cmH<sub>2</sub>O. Mittels JWH-133 Vorbehandlung zeichnete sich ein Trend in Richtung einer Reduktion des maximalen Drucks ( $18,09 \pm 2,7$  cmH<sub>2</sub>O;  $p = 0,06$ ) ab, jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant (siehe Abb.22).



**Abb.22) *in vivo* Messung des portalen Drucks mit und ohne JWH-133 Vorbehandlung 2h vor Versuchsbeginn am Modell TAA (Angaben in MEAN ± SD).**

Die Thioacetamid Behandlung erfolgte gewichtsadaptiert für 126 Tage. Die Vorbehandlung mit JWH-133 (10mg/kg KG 2 Stunden vor Versuchsbeginn) reduzierte den basalen Pfortaderdruck (pmin JWH-133 vs. Kontrolle: 14,68±1,96 cm H<sub>2</sub>O versus 17,85±1,4 cm H<sub>2</sub>O \*p<0.05). Nach LPS Infusion (LPS von E.coli 026:B6, 4mg/kg, 100µl/Minute) wurde in der Kontrollgruppe ein maximaler Pfortaderdruck von 21,26±1,3 cmH<sub>2</sub>O gemessen. Die Vorbehandlung mit JWH-133 erzielte einen reduzierten maximalen Druck von 18,09±2,7 cmH<sub>2</sub>O. Dieses Ergebnis war nicht signifikant (p=0,06).

### 5.3 Auswirkungen der JWH-133 Vorbehandlung auf den systemischen Druck

In den *in vivo* Versuchen BDL und TAA wurde während der gesamten Versuchslaufzeit der systemische Druck gemessen. Der systemische Druck wurde während des *in vivo* Versuchs im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne CB<sub>2</sub> Agonist durch die JWH-133 Behandlung nicht beeinflusst. Es führte weder zu einer systemischen Hypotension noch zu einer reflektorischen Hypertension. Der arterielle Druck war über die gesamte Versuchszeit stabil (Abb.23a, b)

#### **Abb.23a und b) systolischer und diastolischer Druck am in vivo Versuch am Modell**

**BDL.** (Angaben in MEAN ± SD)

Druckwerte sind in Millimeter Quecksilbersäule angegeben.

Über die gesamte Versuchslaufzeit (0.-60. Minute) wurde der systemische Blutdruck gemessen. LPS-Infusion erfolgte von der 6.-12. Minute. Auch unter diesen Bedingungen blieb der systolische und diastolische Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Die Behandlung mit JWH-133 induzierte keine Blutdruckschwankungen.



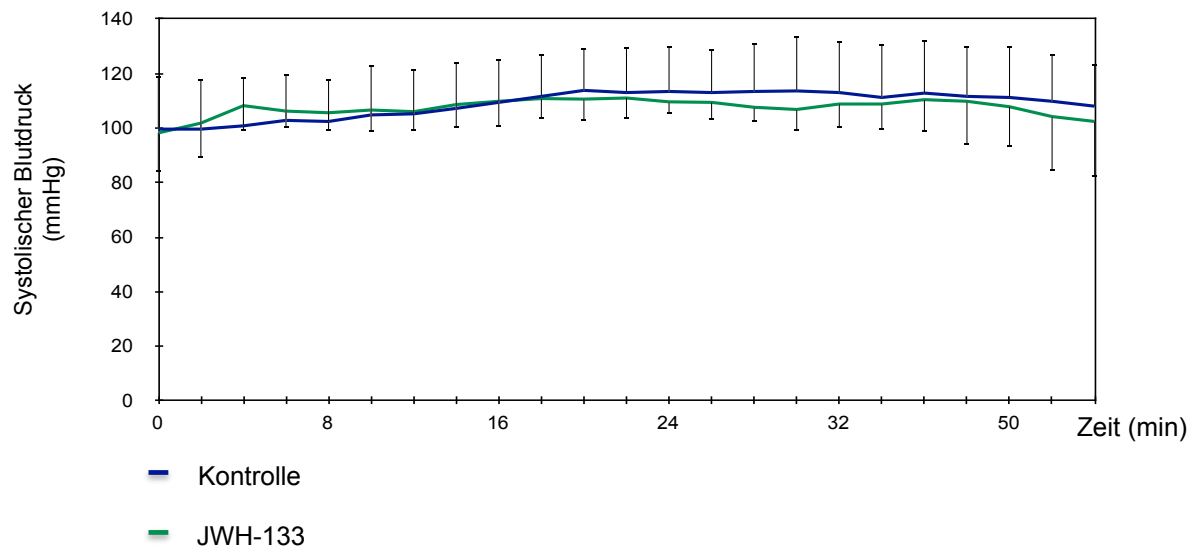


Abb.23a) systolischer Blutdruck im Vergleich JWH-133 vs. Kontrolle

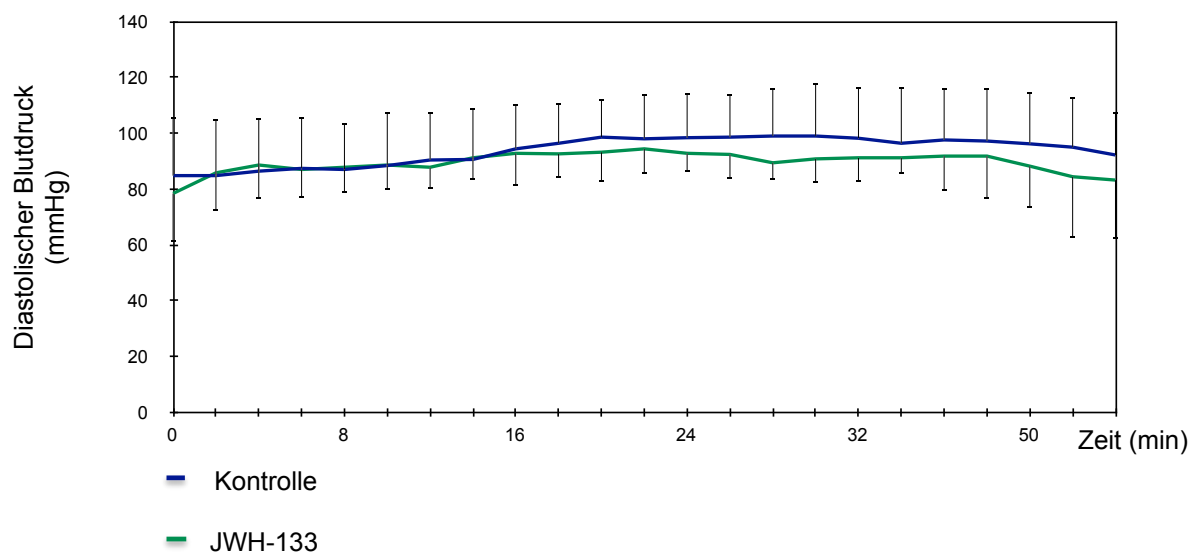


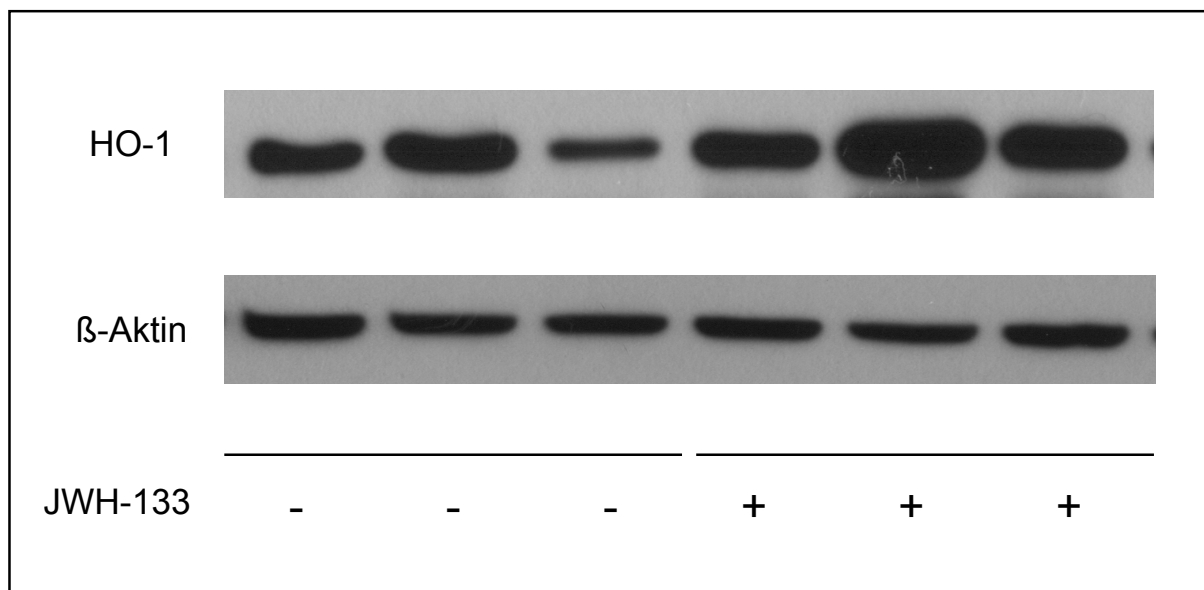
Abb. 23b) diastolischer Blutdruck im Vergleich JWH-133 vs. Kontrolle

#### 5.4 Darstellung der Hämoxxygenase-1 und des CB<sub>2</sub>-Rezeptors nach Stimulation mit dem CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten (JWH-133) im Western Blot

Western Blot Untersuchungen des CB<sub>2</sub> Rezeptors und der HO-1 wurden aus Lysaten der isolierten Leberperfusion am Modell BDL durchgeführt.

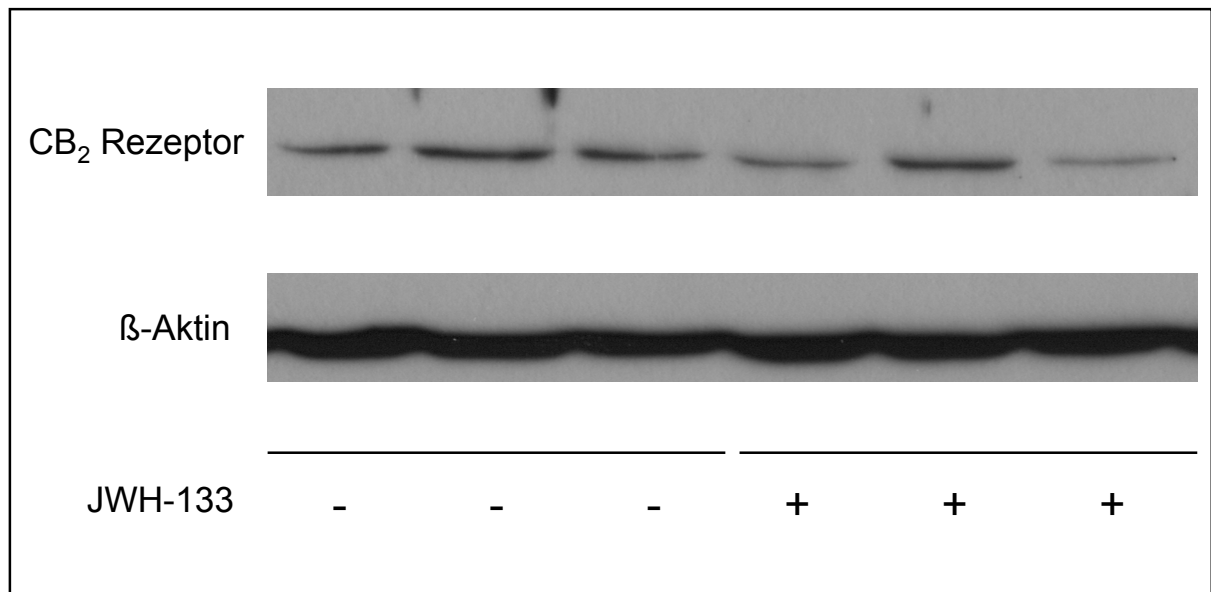
Um den CB<sub>2</sub>-Rezeptor-HO-1 Signalweg weiter zu untersuchen, wurde die HO-1 Proteinexpression nach JWH-133 Behandlung gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die HO-1 Produktion durch JWH-133 gesteigert wird (siehe Abb.24).

Zusätzlich wurde die Proteinexpression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors gemessen. In der Kontrollgruppe ohne JWH-133 Vorbehandlung war der Proteingehalt gering und auch nach Behandlung mit dem CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten konnte keine Vermehrung der Proteinexpression gemessen werden. Der CB<sub>2</sub>-Rezeptor reagierte nicht auf eine Stimulation seines Agonisten mit einer erhöhten Proteinexpression in der erkrankten Leber (siehe Abb.25).



**Abb.24) Western Blot Untersuchungen der HO-1 vor und nach JWH-133 Behandlung der effluenten Leberlysate aus der Versuchsreihe isolierte Leberperfusion am Modell BDL.**

Analysen ergaben eine erhöhte Expression von Hämoxxygenase-1 nach Vorbehandlung mit JWH-133 (10 mg/kg KG für zwei Stunden intraperitoneal) im Vergleich zur Kontrollgruppe.



**Abb.25) Western Blot Untersuchungen des CB<sub>2</sub> Rezeptors vor und nach JWH-133  
Behandlung der effluenten Leberlysate aus der Versuchsreihe isolierte  
Leberperfusion am Modell BDL.**

Stimulation des CB<sub>2</sub> Rezeptors mit seinem Agonisten JWH-133 (10 mg/kg KG für 2 Stunden intraperitoneal) zeigte im Western Blot keine signifikant höhere Expression.

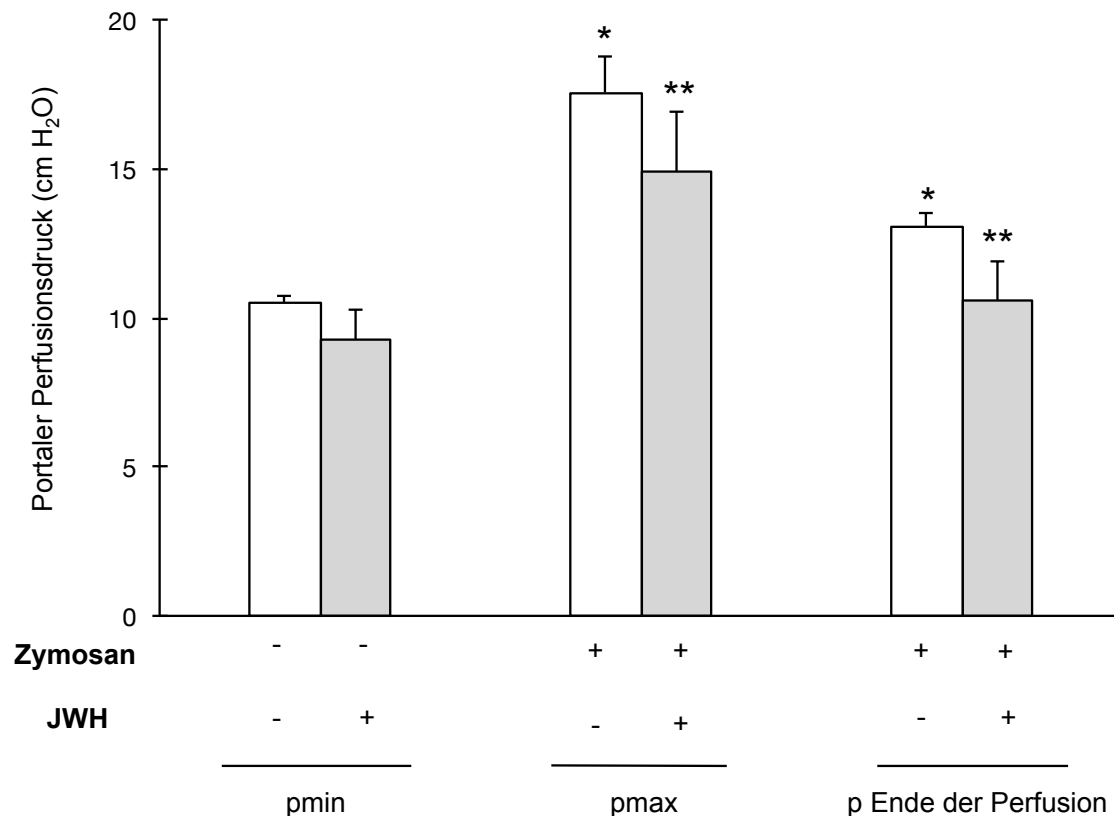
## 5.5 Effekte der JWH-133 Vorbehandlung mit Zymosan-Stimulation an der isolierten Leberperfusion am Modell BDL

An der isolierten Leberperfusion konnte eine signifikante Reduktion des maximalen portalen Drucks mittels JWH-133 erzielt werden. Wie in der *in vivo* Versuchsreihe verringerte die Cannabinoid-Rezeptor-2-Behandlung den portalen Druck.

Die Kupfferzellaktivierung wurde in diesem Versuchsmodell mit Zymosan A, einem Zellwandbestandteil aus Hefezellen, durchgeführt. Zymosan A aktiviert an der Kupfferzelle vornehmlich den TLR Rezeptor 2 und 6. Diese Stimulation führte zu einem massiven Anstieg des portalen Drucks im Vergleich zum Ausgangsdruck der Perfusion (BDL+Zymosan (n=5):  $p_{\min} 10,48 \pm 0,23$  vs.  $p_{\max} 17,56 \pm 1,23$  cm H<sub>2</sub>O \* $p < 0.05$ ). Auch am Ende der Perfusion wurden im Vergleich zu Beginn der Perfusion signifikant höhere Werte gemessen (BDL+Zymosan:  $p_{\min} 10,48 \pm 0,23$  vs.  $p$  Ende der Perfusion  $13,08 \pm 0,42$  cm H<sub>2</sub>O; \* $p < 0.05$ ).

Vergleicht man nun die Ergebnisse mit der Gruppe der JWH-133 vorbehandelten Tiere, so wird deutlich, dass der CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonist die Wirkungen der Zymosan-Infusion signifikant reduziert (BDL+Zymosan vs. BDL+Zymosan+JWH-133:  $p_{\max} 17,56 \pm 1,23$  vs.  $14,88 \pm 2,07$  cmH<sub>2</sub>O ( $p < 0,05$ ) und  $p$  am Ende der Perfusion  $13,08 \pm 0,42$  vs.  $10,6 \pm 1,3$  cmH<sub>2</sub>O; \*\* $p < 0.05$ ).

Im Vergleich zu den *in vivo* Versuchen mit BDL Tieren konnte in der isolierten Leberperfusion keine signifikante Reduktion des basalen Druckes ( $p_{\min}$ :  $p = 0,055$ ) verzeichnet werden (siehe Abb. 26).



**Abb.26) Isolierte Leberperfusion am Modell BDL +/- JWH-133 Vorbehandlung.**

Daten sind alle in MEAN +/- SD abgebildet. Dargestellt ist der Perfusionsdruck in cm H<sub>2</sub>O vor (pmin) und nach Gabe von Zymosan A (pmax) und am Ende der Perfusion, jeweils mit und ohne Vorbehandlung mit JWH-133 (JWH-133 für 2 h, 10 mg/kg KG intraperitoneale Applikation).

Die Vorbehandlung mit JWH-133 zeigte in diesem Versuchsmodell keine signifikante Reduktion des basalen Perfusionsdrucks im Vergleich zur Kontrollgruppe (BDL vs. BDL+JWH-133: pmin 10,48±0,23 vs. 9,26±1,02 cmH<sub>2</sub>O; p=0,055).

Die Kupfferzellaktivierung erfolgte mittels Zymosan A (150 µg/ml, Minute 40 bis 46). Anschließend gemessene Werte zeigten einen signifikanten Druckanstieg (pmax: 17,56±1,23 cmH<sub>2</sub>O). Auch am Ende der Perfusion wurden signifikant höhere Druckwerte gemessen im Vergleich zu den Ausgangswerten (13,08±0,42 cmH<sub>2</sub>O \*p<0.05).

Dieser starke Druckanstieg (pmax und p am Ende der Perfusion) wurde wiederum durch die Vorbehandlung mit JWH-133 reduziert (pmax: 14,88±2,07 cmH<sub>2</sub>O und p am Ende der Perfusion: 10,6±1,3 cm H<sub>2</sub>O; \*\*p<0.05).

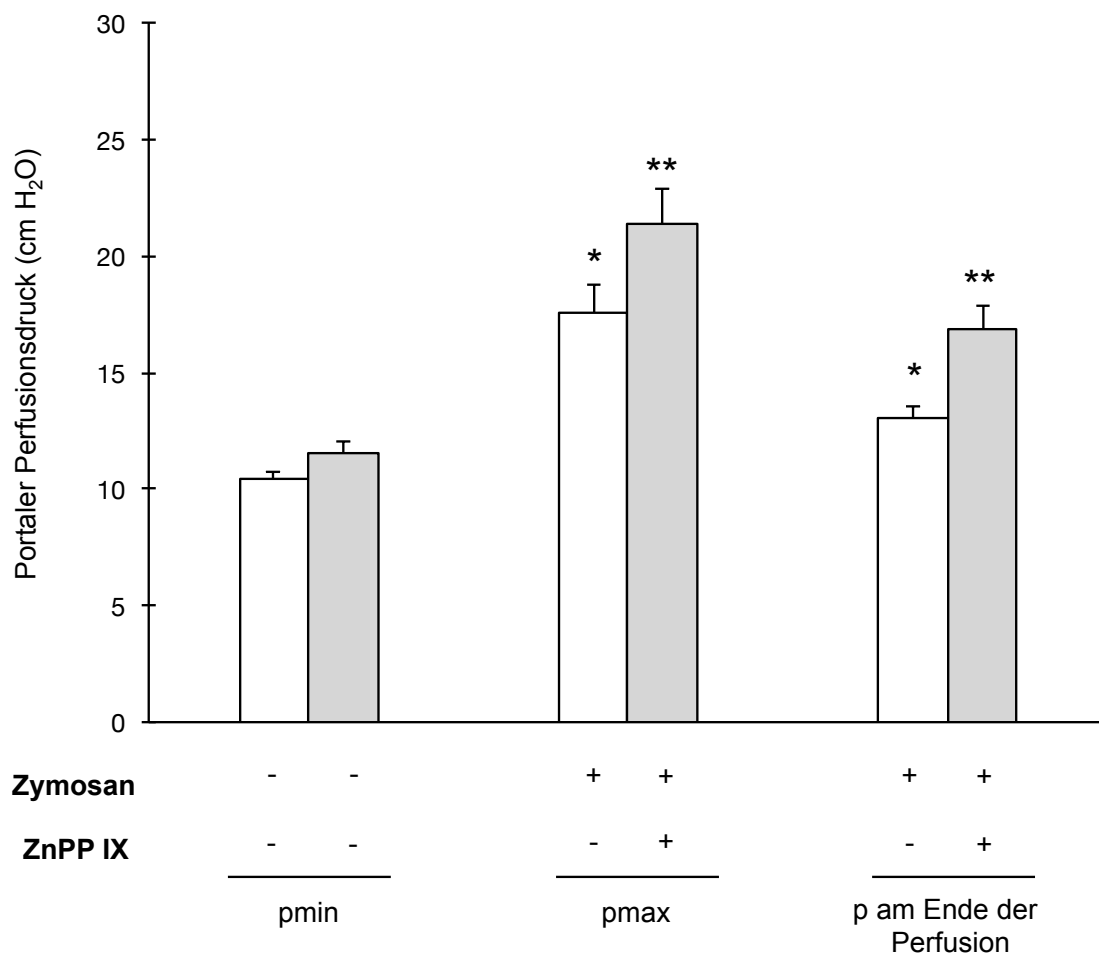
## **5.6 Auswirkungen auf den portalen Perfusionsdruck durch die Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX am Modell BDL**

### **5.6.1 Einfluss der ZnPP IX Gabe auf den basalen, maximalen und den Druck am Ende der Perfusion**

Die HO-1 besitzt protektive Wirkungen in der geschädigten Leber (Makino, Suematsu et al. 2001; Van Landeghem, Laleman et al. 2009; Yang, Zhao et al. 2012). Auf der anderen Seite zeigte die Behandlung mittels JWH-133 eine vermehrte Expression der HO-1. Ziel dieser Versuchsreihe war daher herauszufinden, welche Wirkung die Hemmung HO-1 auf die Kupfferzellaktivierung nach Stimulation mit Zymosan A an der isolierten Leberperfusion hat (Abb. 27).

Der basale Perfusionsdruck (pmin) stellt den Versuchsbeginn dar, zu diesem Zeitpunkt hat noch keine Infusion von Zymosan A oder Hemmung der HO-1 stattgefunden (pmin (BDL ohne Behandlung) Säule 1 und 2:  $10,48 \pm 0,23$  und  $11,53 \pm 0,5$  cmH<sub>2</sub>O). Nach Stimulation der Kupfferzellen mittels Zymosan A kommt es zu einem signifikanten Druckanstieg im portal-venösen System im Vergleich zum basalen Perfusionsdruck (pmin (BDL ohne Behandlung = Säule 1 und 2) vs. pmax (BDL+ Zymosan = Säule 3) :  $10,48 \pm 0,23$  und  $11,53 \pm 0,5$  vs.  $17,56 \pm 1,23$  cmH<sub>2</sub>O; \*p<0,05).

Die HO-1 wurde durch ZnPP IX (1  $\mu$ M, Minute 30 bis 60, n=4) ab der 30. Minute gehemmt. 16 Minuten später wurde Zymosan A (150  $\mu$ g/ml, Minute 40 bis 46) zur Kupfferzellstimulierung intraportal hinzugegeben. Die Antwort auf eine gleichzeitige Kupfferzellstimulation und Blockade der HO-1 ergab einen massiven Anstieg des portalen Perfusionsdruckes (BDL+Zymosan+ZnPP IX = Säule 4: pmax  $21,38 \pm 1,46$  cmH<sub>2</sub>O ). Dieses Ergebnis war signifikant gegenüber der alleinigen Behandlung mit Zymosan (BDL+Zymosan vs. BDL+Zymosan+ZnPP IX: pmax  $17,56 \pm 1,23$  vs.  $21,38 \pm 1,46$  cmH<sub>2</sub>O; \*\*p<0.05). Auch am Ende der Perfusion wurden noch signifikant höhere Druckwerte gemessen (BDL+Zymosan vs. BDL+Zymosan+ZnPP IX : p am Ende der Perfusion  $13,08 \pm 0,42$  vs.  $16,9 \pm 0,92$  cmH<sub>2</sub>O; \*\*p<0.05).



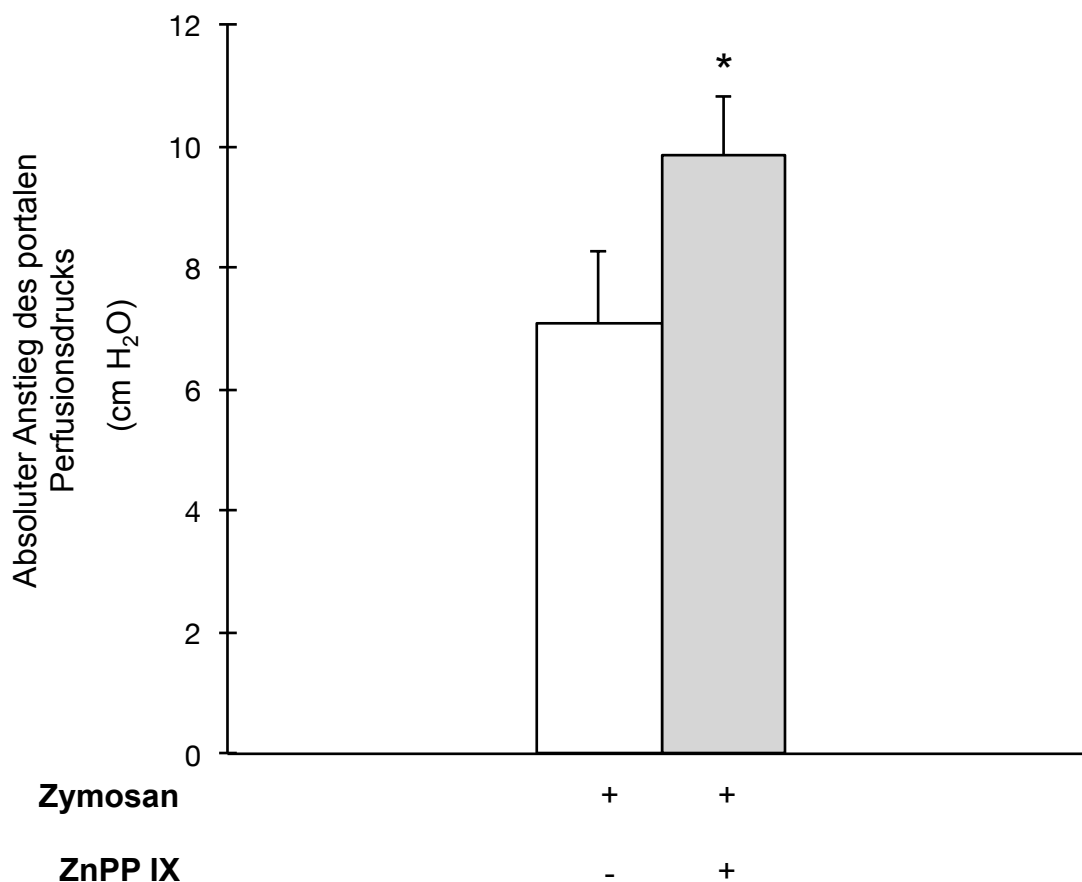
**Abb.27) isolierte Leberperfusion am Modell BDL +/- ZnPP IX und Stimulation mit Zymosan A.** Alle Daten sind in MEAN  $\pm$  S.D. gezeigt.

Der portale Perfusionsdruck ist in cmH<sub>2</sub>O angegeben. Der basale Perfusionsdruck (pmin) stellt den Versuchsbeginn dar (Säule 1 und 2).

Nach Stimulation der Kupfferzellen mittels Zymosan A (Zymosan A, 150  $\mu$ g/ml, Minute 40 bis 46, n=5) kommt es zu einem Druckanstieg im portal-venösen System (Säule 3). Dieser Druckanstieg und Druckwerte am Ende der Perfusion (Säule 5) sind im Vergleich zum Ausgangswert ohne Zymosan A Behandlung (pmin) signifikant höher (\*p<0.05). Durch die Gabe von ZnPP IX (1  $\mu$ M, Minute 30 bis 60, n=4) wurde dieser Druckanstieg signifikant gesteigert im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Zymosan A (\*\*p<0.05).

### 5.6.2. Absoluter Druckanstieg im Vergleich alleiniger Zymosan-Gabe versus ZnPP IX Vorbehandlung mit anschließender Zymosan-Stimulation

Signifikante Unterschiede zeigten die Untersuchungen des absoluten Druckanstiegs im Vergleich zur Kontrollgruppe mit alleiniger Zymosan-Behandlung nach Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX (siehe Abb. 28).



**Abb.28) Absoluter Druckanstieg der isolierten Leberperfusion am Modell BDL.**

Alle Daten sind in MEAN ± S.D angegeben. Dargestellt ist hier der absolute Druckanstieg nach Zymosan A Behandlung +/- ZnPP IX Behandlung.

Vergleicht man den Druckanstieg der beiden Gruppen Zymosan A (Zymosan A, 150 µg/ml, Minute 40 bis 46, n=5) versus die Gruppe Zymosan A + ZnPP IX (ZnPP IX 1 µM, Minute 30 bis 60, n=4), so wird deutlich, dass durch die Hemmung der HO-1 ein signifikanter Anstieg des absoluten portalen Perfusionsdrucks zu messen ist (BDL+Zymosan vs. BDL+Zymosan+ ZnPP IX: pΔ 7,1±1,15 vs. 9,85±0,98 cmH<sub>2</sub>O; \*p<0,05).



## **5.7 Messung der Thromboxan B<sub>2</sub> Bildung im Perfusat nach Hemmung der HO-1 mittels ZnPP IX**

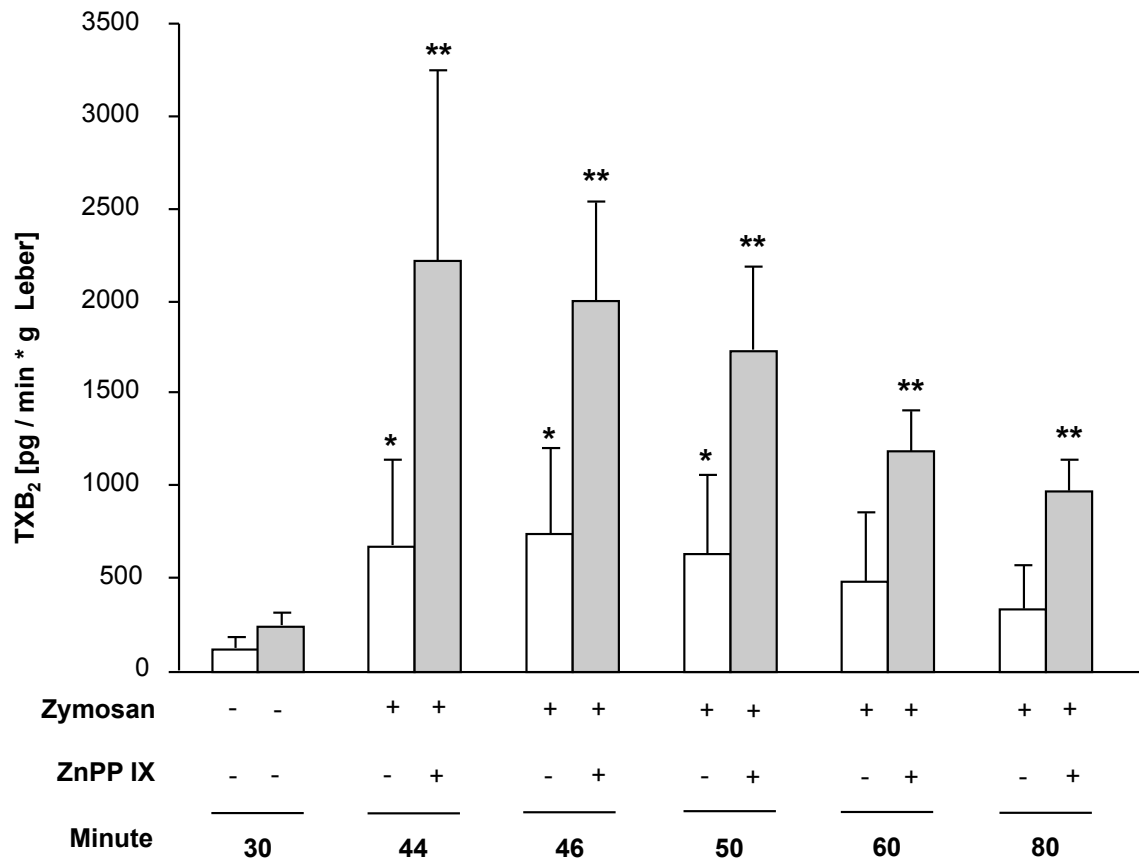
In diesem Versuch wurde aus dem Efflux der Perfusionen Leberlysate gewonnen.

Die Proben wurden nach 30, 44, 46, 50, 60 und 80 Minuten entnommen und auf den Thromboxan B<sub>2</sub>-Gehalt per ELISA untersucht.

Die Kontrollgruppe (n=5) wurde nur mit Zymosan A behandelt. Hier erfolgte eine intraportale Infusion von der 40.– 46. Minute mit 150 µg/ml Zymosan A. Die Gruppe ZnPP IX (n=4) erhielt ab der 30. Minute bis zur 60 Minute eine intraportale Infusion mit ZnPP IX (1 µM pro Minute) und von der 40. Minute bis 46. Minute eine zusätzliche Gabe von Zymosan A in gleicher Konzentration wie die Kontrollgruppe.

Zu Beginn der Perfusion wurden in der Kontrollgruppe geringe Mengen an Thromboxan B<sub>2</sub> gemessen, jedoch 4 Minuten nach Gabe von Zymosan A (150 µg/ml, Minute 40 bis 46) erhöhte sich die Menge an TXB<sub>2</sub> signifikant (Kontrollgruppe Minute 30 vs. Kontrollgruppe Minute 44: 121,29±49,13 vs. 677,14±467,48 pg/min\*g Leber ; \*p<0.05). Die Aktivierung der Kupfferzellen durch die Zymosaninfusion spielt hier eine entscheidende Rolle in Bezug auf die TXB<sub>2</sub> Produktion. Besonders hohe Mengen an TXB<sub>2</sub> wurden über die Minuten 44-50 gemessen.

Durch die zusätzliche Hemmung der Hämoxygenase 1 mittels ZnPP IX (1 µM, Minute 30 bis 60) erhöhte sich die TXB<sub>2</sub> Produktion um mehr als das 3-fache in der 44. Minute verglichen zur Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse waren signifikant (Kontrollgruppe vs. Gruppe ZnPP IX in der 44. Minute: 579,24±379,52 vs. 2231,11±1024,06 pg/min\*g Leber; \*\*p<0.05) (siehe Abb.29).



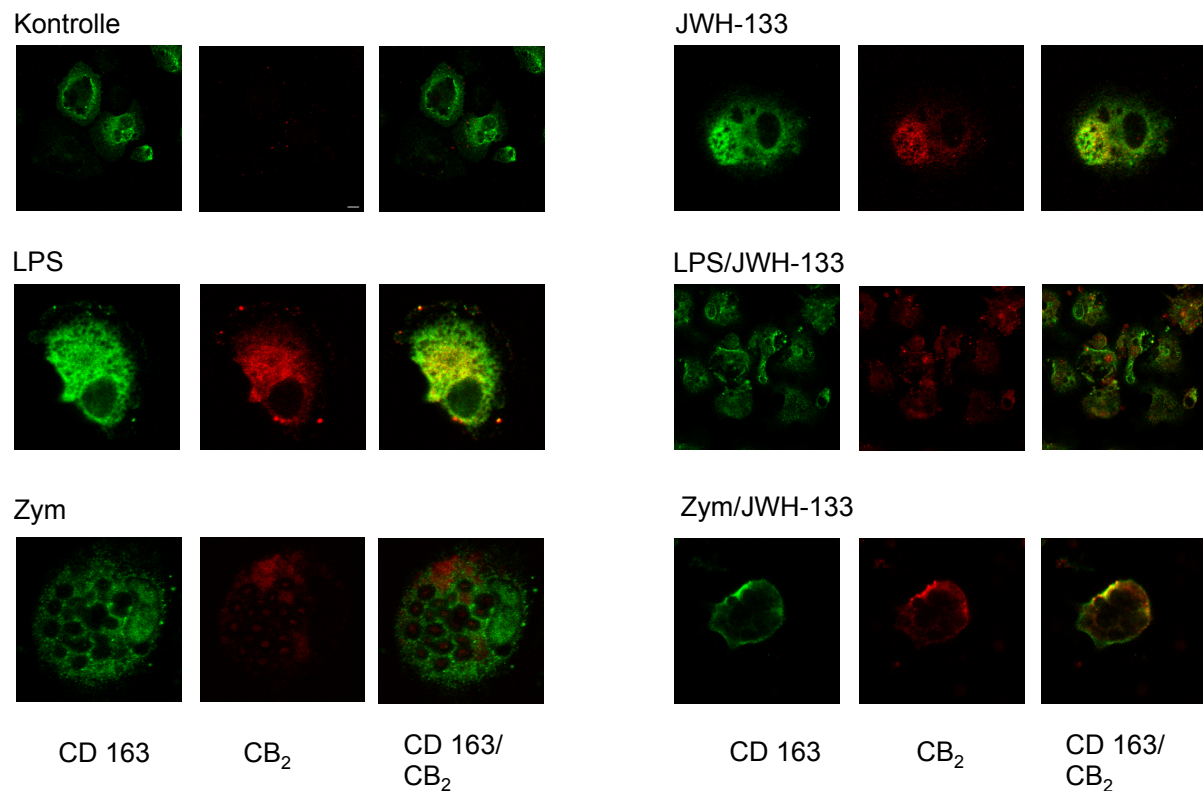
**Abb.29) ELISA Analysen der Thromboxan B<sub>2</sub> Produktion im Verlauf der isolierten Leberperfusion +/- Zymosan A und ZnPP IX Behandlung am Modell BDL.**

Alle Daten sind in MEAN  $\pm$  S.D. angegeben.

Thromboxan B<sub>2</sub> ist in picogramm pro Minute multipliziert mit der Lebermasse in Gramm dargestellt. ELISA Messungen auf TXB<sub>2</sub> wurden aus verschiedenen Messzeiten (30, 44, 46, 50, 60, 80 Minute) der Leberperfusion durchgeführt. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Zymosan A behandelt. Hier erfolgte eine intraportale Infusion von der 40.– 46. Minute mit 150  $\mu$ g/ml, n=5). Die alleinige Gabe von Zymosan A erbrachte eine signifikante Zunahme an TXB<sub>2</sub> im Efflux verglichen ohne Zymosan A (\*p<0.05). Die Gruppe ZnPP IX erhielt ab der 30 Minute bis zur 60 Minute eine intraportale Infusion mit ZnPP IX und von der 40 Minute bis 46 Minute eine zusätzliche Gabe von Zymosan A in gleicher Konzentration wie die Kontrollgruppe. Durch die zusätzliche Gabe von ZnPP IX wurden beträchtliche Mengen TXB<sub>2</sub> gemessen(\*\*p<0.05). Besonders hoch war die TXB<sub>2</sub> Produktion von der 44. bis zur 50. Minute. Jedoch waren die Ergebnisse bis zur 80. Minute signifikant im Vergleich zu TXB<sub>2</sub> Ausschüttungen ohne Hemmung der HO-1(\*\*p<0.05).

## **5.8 Konfokale Mikroskopie: Darstellung der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren vor und nach Behandlung mit JWH-133**

Mit der konfokalen Mikroskopie wurden isolierte Kupfferzellen dargestellt. Die Zellen wurden alle aus gesunden Tieren gewonnen. In einer Präparation wurden n=4 Tiere gepoolt. Über verschiedene Antikörper wurden einzelne Rezeptoren auf der Kupfferzelle sichtbar gemacht. Kupfferzellen gehören zu der Zellgruppe der Makrophagen. Spezifisch für Makrophagen ist der CD-163 Rezeptor. In der durchgeführten konfokalen Mikroskopie wurde dieser Rezeptor zur Identifizierung der Kupfferzelle verwendet. Dieser Rezeptor ist in grüner Farbe in Abb. 30 und 31 abgebildet. Zusätzlich wurde der CB<sub>2</sub>-Rezeptor in der Farbe rot dargestellt. Nur sehr geringe Mengen an CB<sub>2</sub>-Rezeptoren konnten in der Kontrollgruppe ohne LPS oder Zymosan A-Stimulation dargestellt werden. Nach Kupfferzellaktivierung mittels LPS oder Zymosan A wurde die Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors verstärkt. Auch die alleinige Stimulation mit JWH-133 induzierte eine vermehrte Ausbildung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors. Wurden die Zellen sowohl mit JWH-133 und LPS oder JWH-133 und Zymosan behandelt reagierte die Kupfferzelle mit keiner stärkeren Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Substanzen.



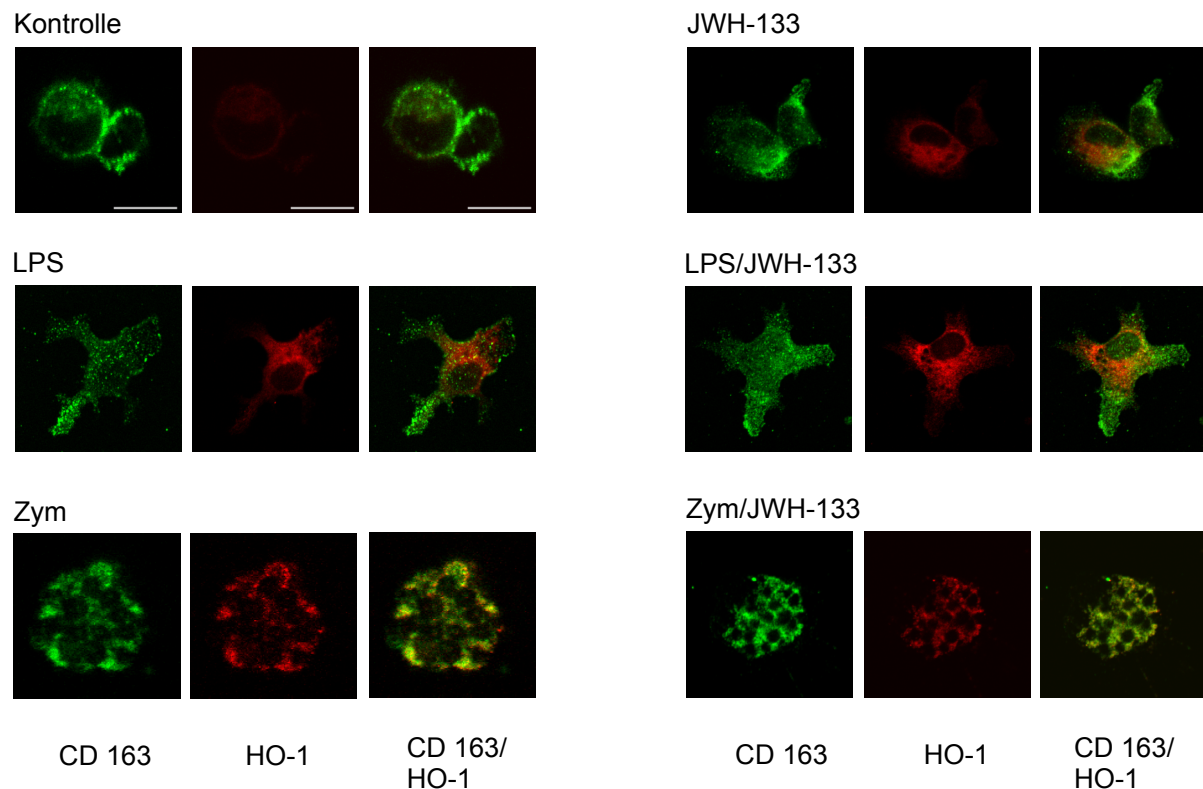
**Abb.30) Verhalten des CB<sub>2</sub>-Rezeptors auf die Stimulation mit LPS oder Zymosan +/- Vorbehandlung mit JWH-133.**

Kupferzellen wurden wie oben beschrieben isoliert. Die konfokale Mikroskopie zeigte nur eine leichte Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors in der Kontrollgruppe. Nach Stimulation mit LPS (3 mg/ml) oder Zymosan A (0.5 mg/ml) über den TLR Rezeptor an der Kupferzelle zeigte sich eine vermehrte Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors. Die zusätzliche Vorbehandlung mit JWH-133 (5 µM) verstärkte diesen Effekt. Durch gleichzeitige Stimulation mit JWH-133, LPS oder Zymosan A addierte sich der Effekt der einzelnen Substanzen nicht. Die Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors wurde durch die Behandlung von JWH-133 + LPS oder JWH-133 + Zymosan nicht weiter verstärkt.

## **5.9 Konfokale Mikroskopie: Darstellung der HO-1 vor und nach Behandlung mit JWH-133**

Die Darstellung der HO-1 in der konfokalen Mikroskopie sollte Aufschluss über eine Verbindung zwischen der HO-1 und den CB<sub>2</sub> Rezeptor Agonisten JWH-133 geben. Durch die Behandlung mit JWH-133 konnte eine vermehrte Expression von HO-1 an der Kupferzelle dargestellt werden. Auch die Kupferzellaktivierung mittels LPS oder Zymosan führte zu einer vermehrten Expression der HO-1. Durch die gleichzeitige Behandlung von JWH-133 + LPS oder JWH-133 + Zymosan A änderte sich die Expression der HO-1 nicht.

Die Expression der HO-1 in der Kontrollgruppe ohne Stimulation zeigte eine marginale Lumineszenz (siehe Abb 31).

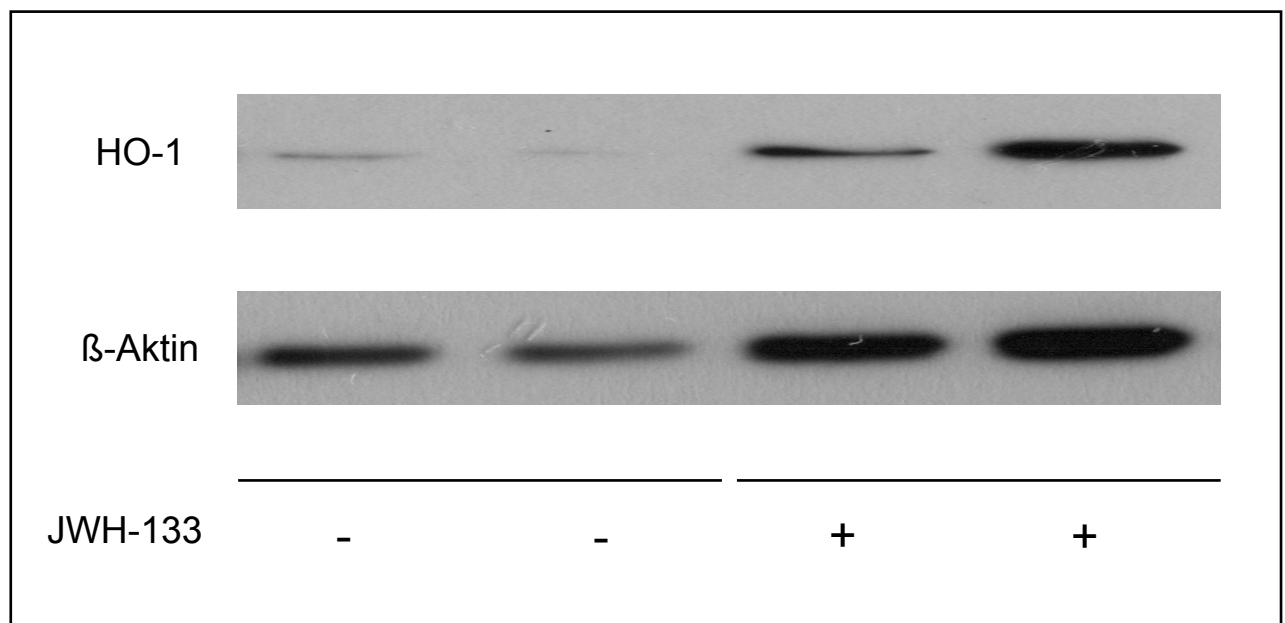


**Abb.31) Konfokale Mikroskopie der HO-1 von isolierten Kupfferzellen zirrhotischer Rattenlebern aus dem Modell BDL.**

In der Kontrollgruppe ist nur eine sehr leichte Expression der HO-1 zu erkennen. Nach Kupfferzellaktivierung mit LPS (3 mg/ml) oder Zymosan (0.5 mg/ml) verstärkt sich die Expression der HO-1. Wie auch schon in den Western Blot Analysen von Leberlysaten gezeigt, konnte auch hier eine Zunahme der HO-1 Expression mittels JWH-133 (5  $\mu$ M) Behandlung an der isolierten Kupfferzellen dargestellt werden. Eine Ko-Stimulation von JWH-133 und LPS oder JWH-133 und Zymosan A erzielte keine weitere Expression der HO-1.

### 5.10 Proteinexpression der HO-1 vor und nach Behandlung mit JWH-133 an der isolierten Kupfferzelle

Um die Aktivität der HO-1 weiter zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen an isolierten KC gesunder Ratten vor und nach Behandlung mit JWH-133 durchgeführt. In gesunden KC ist die HO-1 Aktivität marginal. Dieses Ergebnis stimmt auch mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie überein. Auch hier war die Expression der HO-1 in nicht stimulierten gesunden KC sehr gering ausgeprägt. Die Proteinexpression konnte durch die Vorbehandlung mit JWH-133 signifikant gesteigert werden. Auch in gesunden KC kann die Expression von HO-1 durch JWH-133 gesteigert werden.



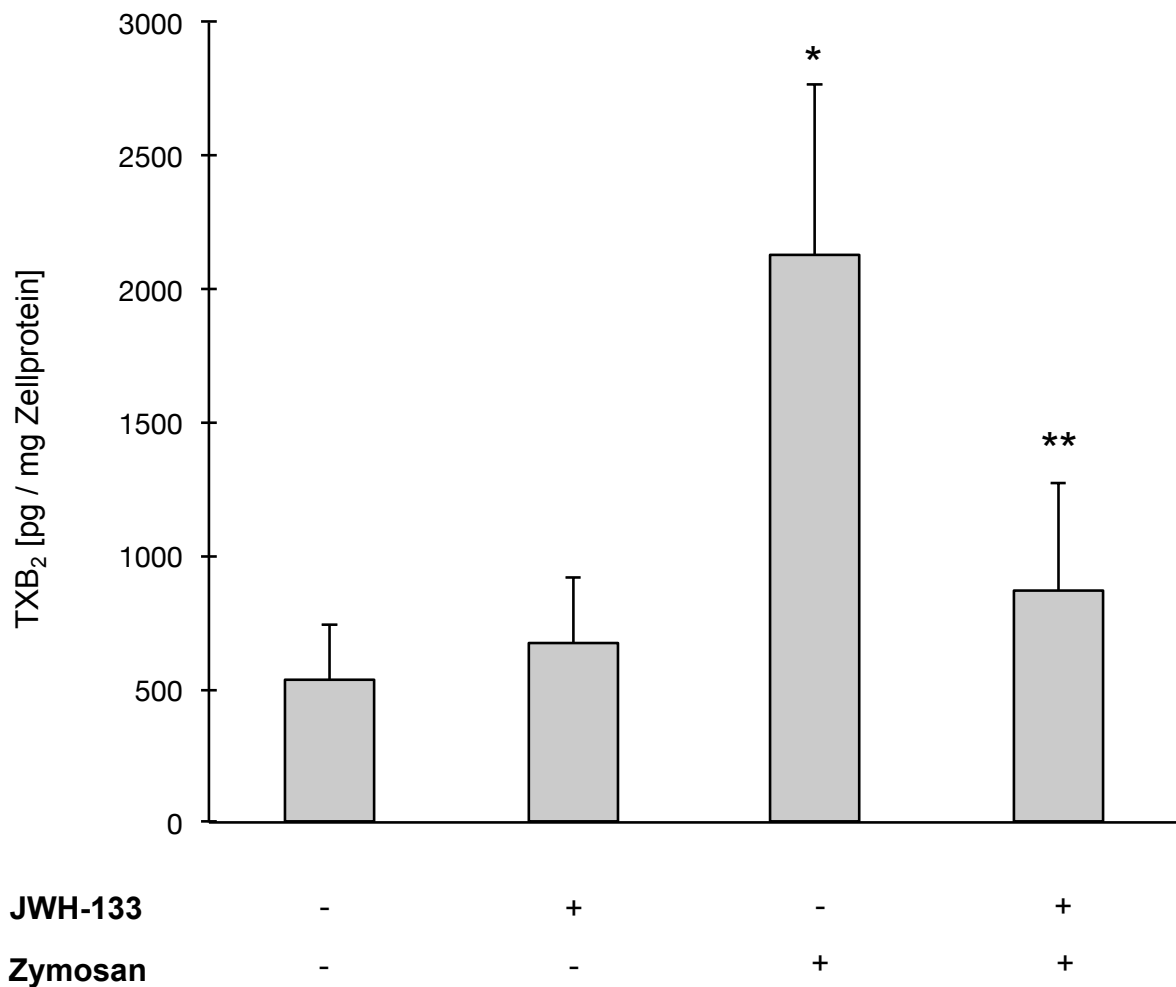
**Abb.32) Western Blot Analysen der HO-1 an der isolierten Kupfferzelle gesunder SD-Ratten.** Isolierte KC aus gesunden Versuchstieren wurden mit JWH-133 (5  $\mu$ M Vorbehandlung für 2 Stunden) stimuliert. Die KC reagierte auf diese Vorbehandlung mit einer vermehrten Expression der HO-1.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle der Western Blot Analyse.

### **5.11 Ermittlung der Thromboxan B<sub>2</sub> Bildung an der isolierten Kupfferzelle nach Stimulation mit JWH-133**

Anhand dieser Untersuchungen der isolierten Kupfferzelle gesunder Tiere lassen sich die Effekte von JWH-133 auf die Thromboxan B<sub>2</sub> Bildung veranschaulichen (siehe Abb. 33).

Keine Behandlung der KC führte nur zu einer geringen Bildung von TXB<sub>2</sub> (Kontrolle: 535,26±190,54 pg TXB<sub>2</sub> pro mg Zellprotein (n=9)). Auch die Vorbehandlung mit JWH-133 induzierte keine verminderte oder gesteigerte Synthese von TXB<sub>2</sub> (alleinige JWH-Behandlung: 612,76±201,62 pg TXB<sub>2</sub> pro mg Zellprotein (n=6)). Erst durch die Stimulation mit Zymosan (n=6) wurden signifikant höhere Werte gemessen (alleinige Zymosan-Stimulation vs. Kontrolle: 2129,74±583,55 vs. 535,26±190,54 pg TXB<sub>2</sub> pro Gramm Zellprotein (\* p<0,005)). Durch die Vorbehandlung mit JWH-133 (n=6) konnte dieser Effekt beträchtlich gemindert werden (Zymosan vs. JWH-133 + Zymosan: 2129,74±583,55 vs. 780,34±346,91 pg TXB<sub>2</sub> pro mg Zellprotein (\*\* p<0,005)).





**Abb.33) Thromboxan B<sub>2</sub> Produktion isolierter Kupferzellen nach Stimulation mit JWH-133 und Zymosan A.** Kupferzellaktivierung mit Zymosan A (0.5 mg/ml) für eine Stunde resultierte in einem signifikanten Anstieg des TXB<sub>2</sub> Efflux im Vergleich zu Kupferzellen ohne Stimulation (\*p<0.05). Wurden die Zellen mit JWH-133 vorbehandelt (5 µM, 3 h), so konnte die TXB<sub>2</sub> Produktion signifikant gemindert werden (\*\*p<0.05).

## 6. Diskussion

Die portale Hypertension ist eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose. In vielen Fällen verläuft die portale Hypertension aufgrund einer Varizenruptur oder SBP mit Leberversagen letal. Bis heute stehen keine kurativen Therapieoptionen abgesehen von der Lebertransplantation zur Verfügung. In den letzten Jahren wurde die Wirkung von Cannabinoiden und ihrer Rezeptoren in Bezug auf akute und chronische Lebererkrankungen genauer untersucht. Cannabinoide wirken über CB<sub>1</sub>- oder CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und lösen dadurch unterschiedliche Wirkungen aus. Die Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors führt über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- $\alpha$ . Dagegen kommt es durch die Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors zur Protektion vor inflammatorischen Prozessen.

Ziel dieser Arbeit war es eine neue Therapieoption zur Verhinderung und/oder Reduktion der portalen Hypertension zu untersuchen. Als Hypothese galt, dass die Aktivierung von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren durch spezifische CB<sub>2</sub>-Agonisten den portalen Druck senkt. Dies sollte nun am Zirrhose-Modell BDL und TAA in *in vivo* und *in situ* Versuchen untersucht werden.

Die genaue Wirkweise der Cannabinoide und ihrer Rezeptoren in der Leber ist auf molekularer Ebene noch nicht verstanden. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit beschäftigten sich daher mit einem potentiellen Signalweg zwischen CB<sub>2</sub>-Rezeptor und der Hämoxygenase-1 und der Wirkung auf die Sekretion von Vasokonstriktoren, wie vor allem Thromboxan A<sub>2</sub>.

Folgende Ergebnisse dieser Arbeit sind festzuhalten:

- Die Vorbehandlung mit CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonist JWH-133 reduzierte den portalen Druck in *in vivo* und *in situ* Versuchen im Modell TAA und BDL.
- Die Vorbehandlung mit JWH-133 hatte keinen Einfluss auf den systemischen Blutdruck.

- Mit Zymosan stimulierte, isolierte KC aus gesunden Tieren bildeten signifikant weniger TXB<sub>2</sub> nach einer Vorbehandlung mit JWH-133 als die Kontrollgruppe ohne JWH-133 Vorbehandlung.
- Der CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist JWH-133 induziert in der zirrhotischen Leber eine gesteigerte Expression von HO-1.
- An isolierten KC aus gesunden Lebern konnte mittels JWH-133 oder LPS oder Zymosan die Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors und der HO-1 induziert werden.
- Die Hemmung der HO-1 induziert eine Steigerung der portalen Hypertension am *in situ* Modell der isoliert perfundierten Leber sowie eine vermehrte Ausschüttung von TXB<sub>2</sub>.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass der aktivierte CB<sub>2</sub>-Rezeptor durch spezifische CB<sub>2</sub>-Agonisten maßgeblich an der Reduzierung des portalen Drucks beteiligt ist. Über noch ungeklärte Signalwege führt die Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors zu einer vermehrten Expression der HO-1. Die Folge der Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors und der gesteigerten Bildung von HO-1 ist eine verminderte Ausschüttung von TXB<sub>2</sub> und damit eine Senkung des portalen Drucks.

## 6.1 Wirkung von CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten auf den portalen Druck bei Leberzirrhose am Rattenmodell

CB<sub>2</sub>-Rezeptoren induzieren Signalwege mit anti-inflammatorische Eigenschaften in der Leber. In Studien am Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass sie protektive Wirkungen bei der Fibrogenese (Munoz-Luque, Ros et al. 2008) und bei der Entzündungsreaktion nach einem Ischämie/Reperfusionsschaden haben (Batkai, Osei-Hyiaman et al. 2007; Rajesh, Pan et al. 2007).

In unseren Experimenten konnte durch die Vorbehandlung mit einem selektiven CB<sub>2</sub>-Agonisten an der zirrhotischen Ratte eine signifikante Reduzierung des portalen Drucks *in vivo* gezeigt werden (Abb.21). Es kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die Induktion des CB<sub>2</sub>-Rezeptors protektive Wirkung hat. Nicht nur in der cholestatisch induzierten Leberzirrhose (BDL) sondern auch in der toxisch induzierten Leberzirrhose (TAA) konnte diese Hypothese bestätigt werden.

Um die hepatische Wirkung der CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten (JWH-133) besser untersuchen zu können, führten wir isolierte Leberperfusionen mit Leukozyten-freiem Puffer an JWH-133 vorbehandelten BDL Tieren durch. Die Ergebnisse bezüglich der Reduzierung des portalen Drucks waren mit den *in vivo* Versuchen vergleichbar. In der Veröffentlichung von Lin et al. (Lin, Yang et al. 2011) wurden vergleichbare Ergebnisse am *in situ* BDL-Modell beschrieben. Allerdings wurden die Tiere mit Methoxamin, einem potenten Vasokonstriktor, vorbehandelt. Anschließend wurde der CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist injiziert. Der Zeitpunkt und die Verabreichungsform von JWH-133 wurde in dieser Studie nicht eindeutig beschrieben. Des Weiteren wurde nur der basale Perfusionsdruck gemessen. In Versuchen an BDL-Tieren am Modell *in vivo* zeigten wir, dass durch die Vorbehandlung mit JWH-133 nicht nur der basale Druck sondern auch der maximale portale Druck nach LPS-Stimulation gesenkt werden konnte. Ergebnisse an den Versuchstieren der Gruppe TAA zeigten eine signifikante Reduktion des basalen Drucks. Der maximale Druck wurde durch die JWH-133 Vorbehandlung gesenkt, jedoch wurden hier keine signifikanten Ergebnisse erzielt ( $p=0,06$ ). Es zeigte sich jedoch ein deutlicher Trend der JWH-133 behandelten Tiere. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Ergebnis könnte die unterschiedliche Ätiologie der Leberzirrhose sein. Eine BDL induzierte Leberzirrhose ist im Vergleich zur TAA induzierten Leberzirrhose mit einer schwergradigen Inflammation und vermehrtem oxidativen Stress assoziiert (Van Landeghem, Laleman et al. 2009). Des Weiteren

könnte die unterschiedliche Expression der HO-1 im Modell TAA und BDL eine Rolle spielen (Van Landeghem, Laleman et al. 2009). In einer Studie von Van Landeghem et al. 2009 konnte gezeigt werden, dass die Expression von HO-1 im Modell TAA im Vergleich zum Modell BDL vermindert war (Van Landeghem, Laleman et al. 2009). Zudem besteht die Hypothese, dass der CB<sub>2</sub>-Agonist JWH-133 mit der HO-1 in der zirrhotischen Leber interagiert und zu einer Reduktion des portalen Drucks führt (siehe 6.3).

Die Wirkung von JWH-133 auf den maximalen Pfortaderdruck könnte jedoch von großer klinischer Bedeutung sein. Druckspitzen im prähepatischen Gefäßbett werden für die Ruptur von Varizen bei Patienten mit Leberzirrhose verantwortlich gemacht (Goulis, Patch et al. 1999). Diese Druckspitzen sind möglicherweise bedingt durch eine Translokation bakterieller Bestandteile aus dem gastrointestinalen Trakt in das portale Blut. Grund hierfür ist eine Permeabilitätsstörung der Darmwand. Die Folge ist ein gesteigerter Anteil pathogener Partikel im portalen Blut. Diese wiederum führen zu einer starken Stimulation der TLR-Rezeptoren (Enomoto, Ikejima et al. 2001). Das Resultat ist eine vermehrte Aktivierung von KC und möglicherweise deren Differenzierung in eine M1 Population mit großem proinflammatorischen Potential (Mantovani, Sica et al. 2005; Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Die Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten erzielte in dem Modell BDL eine signifikante Reduktion des portalen Drucks nach TLR-Stimulation (Abb. 21) und eine geringere Reduktion in der Gruppe TAA (Abb.22).

Welche Signalkaskaden durch den CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten im Detail aktiviert werden, ist noch nicht bekannt.

Eine mögliche Erklärung könnten die von Louvet et al. gemachten Beobachtungen sein: Bei Tieren mit äthyltoxischer Leberzirrhose hatte die Stimulation mit JWH-133 zur Folge, dass weniger KC sich zu einer M1 Population differenzierten (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Im gleichen Experiment zeigte sich keine Beeinflussung der M2 Population durch die Behandlung mit JWH-133. Daher wurde von diesen Arbeitsgruppen die Hypothese aufgestellt, dass CB<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonisten M1 polarisierte KC hemmen oder diese anregen in eine M2-polarisierte Zelle überzugehen (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011; Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013).

Die Fokussierung auf eine M2-Population könnte möglicherweise eine verminderte Produktion von Vasokonstriktoren zur Folge haben und könnte eine Erklärung für den verminderten Druckanstieg sein.

Nach dieser Hypothese müsste die Konversion in eine M2-polarisierte KC oder die Hemmung der M1-polarisierten KC innerhalb kürzester Zeit passieren, da in unseren Versuchen der CB<sub>2</sub>-Agonist nur zwei Stunden vor Versuchsbeginn verabreicht wurde und in den *in vivo* und *in situ* Versuchen der portale Druck im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert werden konnte. In dieser Zeit müssten demnach Signalkaskaden aktiviert werden, die zu einem verminderten intrahepatischen Widerstand führen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Huang et al. beschrieben (Huang, Wang et al. 2012). Hier wurde am Modell BDL sogar nur 30 Minuten vor Versuchsbeginn ein selektiver CB<sub>2</sub>-Agonist intraperitoneal injiziert und danach ein verminderter Pfortaderdruck gemessen. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde hier keine weitere Stimulation mit LPS vorgenommen. Aus diesem Ergebnis könnte man folgern, dass durch die Stimulation mit JWH-133 die CB<sub>2</sub>-Rezeptoren maximal aktiviert und exprimiert werden. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine zusätzliche Behandlung mit LPS oder Zymosan zu keiner weiteren Steigerung der CB<sub>2</sub>-Rezeptordichte führt.

Auch die chronische Applikation von CB<sub>2</sub>-Agonisten, wie sie in der Arbeitsgruppe Louvet et al. vorgenommen wurde, führte zu einer Senkung des portalen Drucks (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011).

Die Gabe von CB<sub>2</sub>-Agonisten könnte eine Therapieoption zur Minderung von endotoxämisch bedingten Druckspitzen bei Patienten mit portaler Hypertension sein. Es fehlen jedoch gezielte Vergleiche von JWH-133 in der Anwendung, Verabreichungsdauer, -länge und Konzentration in Bezug auf die Reduktion der portalen Hypertension und der Antiinflammation.

Ein Nachteil bei der Behandlung mit Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten war der negative Einfluss auf die hämodynamische Dysbalance in der zirrhotischen Leber. In einer Studie konnte demonstriert werden, dass dieser negative Einfluss auf die Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors zurückzuführen war (Batkai, Jarat et al. 2001). Im Gegensatz dazu wurde bei der Vorbehandlung mit spezifischen CB<sub>2</sub>-Agonisten keine Beeinträchtigung des systemischen Kreislaufs beobachtet (Abb.25)(Munoz-Luque, Ros et al. 2008; Tam, Liu et al. 2011).

Bislang wurden nur Experimente mit CB<sub>2</sub>-Agonisten an Ratten- und Mäuselebern durchgeführt. Ihre Ergebnisse sind vielversprechend, da durch die CB<sub>2</sub>-Agonisten nicht nur die portale Hypertension sondern auch wichtige inflammatorische Prozesse wie die Fibrogenese und die Angiogenese positiv beeinflusst werden konnten und

außerdem keine Belastung des systemischen Kreislaufs im Kurzzeitversuch nachgewiesen werden konnte (Huang, Wang et al. 2012).

## **6.2 Reaktion der Kupfferzellen nach Stimulation mit JWH-133**

Kupfferzellen (KC) spielen eine große Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung der portalen Hypertension. Die Stimulation von KC über bakterielle Produkte führt in der geschädigten Leber zu einer Aktivierung von HSC (Zhang, Yu et al. 2004), der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten und zur Steigerung der Produktion von  $\text{TNF-}\alpha$  und vasokonstringierender Mediatoren wie ROS,  $\text{TXA}_2$  und LT (Bilzer, Roggel et al. 2006).

Die Stimulation der KC mittels Zymosan-getriggelter Aktivierung der TLR-2 und -6 Rezeptoren in der zirrhotischen Rattenleber am Modell der isolierten Leberperfusion resultierte in einem erhöhtem  $\text{TXB}_2$ -Efflux (Abb.28). Die Folge ist eine Steigerung des portalen Drucks mit erhöhtem Risiko der Varizenruptur (Yokoyama, Xu et al. 2003; Xu, Korneszczyk et al. 2005).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es Mechanismen zu finden, die diese inflammatorische Wirkung der KC zu hemmen vermögen und konsekutiv zur Senkung des portalen Drucks führen.

Wir untersuchten daher die Wirkung des  $\text{CB}_2$ -Rezeptors in der gesunden isolierten KC. Die Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen wie LPS oder Zymosan führte zur Ausbildung von Mikrovilli und zur vermehrten Phagozytoseaktivität der KC, wie die konfokale Mikroskopie zeigen konnte (Abb.30 und 31).

In der gesunden Leber zeigt das Cannabinoid-System nur geringe Aktivität (Buckley, Hansson et al. 1998; Mallat and Lotersztajn 2008). An isolierten KC aus gesunden Tieren lässt sich nur eine marginale Expression des  $\text{CB}_2$ -Rezeptors darstellen. Erstmals konnte demonstriert werden, dass durch bakterielle Bestandteile wie LPS und Zymosan die  $\text{CB}_2$ -Rezeptordichte in isolierten KC gesteigert wurde. Eventuell könnte es demnach einen Link zwischen den TLR Rezeptoren 2, 4, und 6 und der Induktion des  $\text{CB}_2$ -Rezeptors geben. Die TLR-getriggerte Aktivierung des  $\text{CB}_2$ -Rezeptors könnte einen negativen Feedback Kreislauf auf die Synthese proinflammatorischer Mediatoren auslösen und eine überschießende Produktion an inflammatorischen Faktoren verhindern. In einer Studie an dendritischen Zellen

konnte erstmals die LPS-getriggerte Stimulation von MyD88 durch Vorbehandlung mit JWH-133 inhibiert werden (Xu, Cheng et al. 2007). Auch in Mikrogliazellen hat die Stimulation von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren hemmende Wirkung auf die LPS-getriggerte NFκB Aktivierung (Correa, Hernangomez et al. 2010). Ob diese Erkenntnisse übertragbar sind auf die KC bleibt ungeklärt. Versuchsergebnisse der Arbeitsgruppe Louvet et al. 2011 demonstrierten an isolierten KC aus CB<sub>2</sub><sup>-/-</sup> Knockout Mäusen eine gesteigerte Bildung von TNF-α, NOS und IL-6 nach 6-stündiger Stimulation mit LPS. An isolierten RAW264.7-Makrophagen konnte im Umkehrschluss mittels 18 stündiger JWH-133 Behandlung in einer Konzentration von 5μM eine signifikante Reduktion der LPS-getriggerten Synthese von TNF-α, NOS und IL-6 erreicht werden (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Zu einem vergleichbaren Resultat kam die Arbeitsgruppe Horvath et al. 2012. Sie demonstrierten an isolierten KC gesunder Mäuse die konzentrationsabhängige Wirkung des CB<sub>2</sub>-Agonisten, HU-910 auf die LPS-getriggerte TNF-α Produktion. Die KC wurden 6 Stunden mit LPS behandelt. Eine Stunde vor LPS Applikation wurde HU-910 hinzugegeben. Eine signifikante Reduktion der TNF-α Produktion konnte ab einer Konzentration von 3 μM HU-910 erreicht werden (Horvath, Magid et al. 2012). Wahrscheinlich sind geringere Inkubationszeiten mit CB<sub>2</sub>-Agonisten möglich, um ähnliche Ergebnisse zu erreichen. Alle oben genannten Ergebnisse sprechen für die Hypothese, dass CB<sub>2</sub>-Agonisten dem TLR-induzierten intrazellulären Signalweg entgegenwirken.

In den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten führte die Stimulation mit CB<sub>2</sub>-Agonisten zu einer gesteigerten Expression des CB<sub>2</sub>-Rezeptors in isolierten KC (Abb.30). Ko-Stimulation mit JWH-133 und LPS oder Zymosan erbrachten keine weitere Steigerung der CB<sub>2</sub>-Rezeptor Expression (Abb. 25 und 30). Dieser Befund bestätigt die oben genannte Vermutung, dass nach JWH-133 Behandlung die Aktivität und Expression der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren ein Plateau erreicht haben und eine weitere Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen keinen weiteren Effekt bewirkt.

Die Markierung der KC in der konfokalen Mikroskopie erfolgte mittels CD163. Dieser Marker wird vor allem von M2-differenzierten KC gebildet (Mosser 2003; Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011; Tam, Liu et al. 2011). Es wurden somit hauptsächlich M2-differenzierte KC in der konfokalen Mikroskopie dargestellt. M1 differenzierte KC exprimieren hauptsächlich CD86 (Mosser 2003). Es kann daher anhand der konfokalen Mikroskopie keine Aussage über die Expression von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren in M1-differenzierten KC gemacht werden. Festgehalten werden kann jedoch, dass M2-



differenzierte KC über Stimulation der TLR Rezeptoren 2, 4 und 6 mittels LPS und Zymosan vermehrt CB<sub>2</sub>-Rezeptoren exprimieren.

Die Vorbehandlung mit JWH-133 und die anschließende Stimulation mittels Zymosan an der isolierten KC erbrachte eine signifikante Reduzierung der TXB<sub>2</sub> Ausschüttung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine Konversion von M1- zu M2-differenzierten KC sein, da M2-differenzierte KC eine hemmende Wirkung auf die Bildung von TXA<sub>2</sub> haben. Die Arbeitsgruppe Huang et al. (Huang, Wang et al. 2012) zeigte, dass durch die Behandlung mit selektiven CB<sub>2</sub>-Agonisten sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression von COX reduziert wird. Jedoch sind die intrazellulären Signalwege der CB<sub>2</sub>-Agonisten und ihre Wirkung auf die Synthese von TXA<sub>2</sub> kaum geklärt.

Zusätzlich müssten noch isolierte KC chronisch kranker Tiere untersucht und mit den Ergebnissen von gesunden KC verglichen werden. Des Weiteren müsste die Definition für KC mit M1- oder M2-Polarisation genauer eingegrenzt und die Konversion der Zellen genauer untersucht werden.

### **6.3 Zusammenhang zwischen CB<sub>2</sub>-Agonisten und der HO-1 an der isolierten Kupfferzelle**

In der gesunden Leber werden die CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und die HO-1 nur sehr gering exprimiert und spielen daher unter normalen Umständen nur eine geringe Rolle. Eine akute oder chronische Leberschädigung induziert die Proteinsynthese der HO-1 und die Expression der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren.

In dieser Arbeit galt es herauszufinden, ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der HO-1 Synthese und deren Aktivität und der Expression der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren gibt. Wir untersuchten daher die Wirkung von CB<sub>2</sub>-Agonisten (JWH-133) auf die Expression und Aktivität der HO-1 vor und nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen in der isolierten KC. Über Western Blot Analysen und konfokaler Mikroskopie kamen wir zu folgendem Ergebnis:

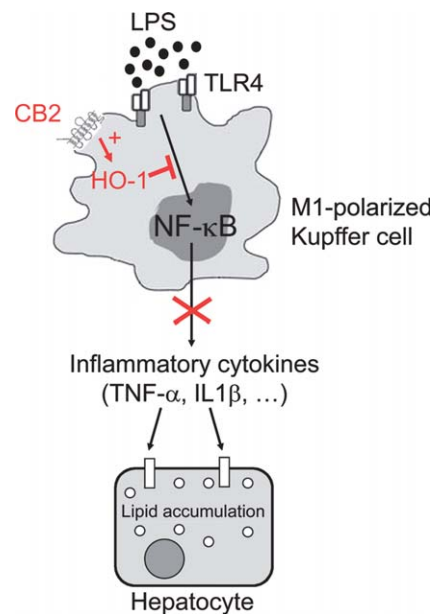
Western Blot Analysen aus Leberlysaten erkrankter BDL Tiere ergaben eine gesteigerte Aktivität der HO-1 mit JWH-133 Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne JWH-133 Vorbehandlung (Abb.24). Dieser Befund konnte am Modell der isolierten KC bestätigt werden (Abb.32). JWH-133 steigert die Expression

von HO-1 sowohl *in vitro* als auch *in situ*. Zu vergleichbaren Ergebnissen ist auch die Arbeitsgruppe Louvet et al. 2011 (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011) gekommen. Isolierte KC aus zirrhatischen Mäuselebern und RAW-Makrophagen zeigten eine gesteigerte Bildung und Aktivität der HO-1 nach JWH-133 Behandlung. Der Unterschied zwischen den Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe Louvet et al. 2011 und den hier vorgestellten Experimenten war zum einen ein unterschiedliches Tiermodell und zum anderen die Dauer der JWH-133 Behandlung. Louvet et al. behandelte die KC mit JWH-133 in einer Dosis von 5µM für 24 Stunden. In unseren Experimenten wurde JWH-133 drei Stunden vor Versuchsbeginn in gleicher Dosis verabreicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass auch durch eine kurzfristige Applikation des CB<sub>2</sub>-Agonisten eine Induktion der HO-1 hervorgerufen werden kann. Mittels konfokaler Mikroskopie wurde an isolierten KC gesunder Tiere die Expression von HO-1 und CB<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht. In der Kontrollgruppe ohne Stimulation von LPS oder Zymosan konnten nur sehr geringe Mengen der HO-1 sowie der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren detektiert werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch in der konfokalen Mikroskopie isolierter KC eine verstärkte Lumineszenz sowohl nach LPS als auch nach Zymosan-Applikation. Auch die alleinige Stimulation mit JWH-133 ergab eine Induktion der HO-1 Synthese. Ko-Stimulation von JWH-133 und LPS oder JWH-133 und Zymosan ergaben keine weitere Steigerung der Expression von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren oder HO-1 (Abb.31).

Jedoch ist auch hier wieder zu erwähnen, dass in der konfokalen Mikroskopie isolierte KC nur mit CD163 markiert wurden. Der Marker CD163 an Makrophagen besitzt stimulierende Wirkung auf die HO-1 Synthese (Philippidis, Mason et al. 2004; Sierra-Filardi, Vega et al. 2010). Des Weiteren wird CD163 und HO-1 vermehrt in M2-polarisierten Makrophagen exprimiert und CD163 wird als Marker für M2-polarisierte Makrophagen benutzt (Sierra-Filardi, Vega et al. 2010; Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011). Die in der konfokalen Mikroskopie dargestellten KC gehören somit hauptsächlich zur Population der M2-differenzierten KC. Allerdings liegt bislang noch keine genaue Definition bezüglich M1- und M2-polarisierter KC vor.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man schließen, dass CD163+ KC nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen ihre anti-inflammatorischen Signalwege in kürzester Zeit maximal exprimieren und weitere Reize keine Steigerung erzielen.

Der Signalweg zwischen CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und HO-1 könnte ein potentieller Schutzmechanismus auf inflammatorische Reaktionen nach Kontakt zu bakteriellen Produkten sein.

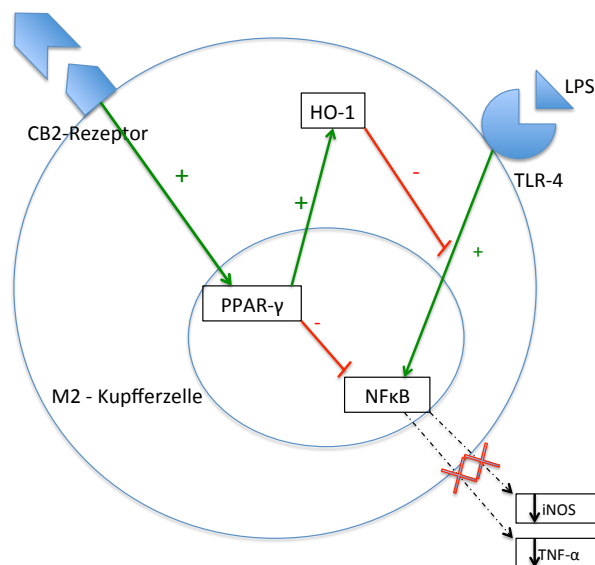


**Abb.34) aus Louvet et al. 2011 (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011): schematische Darstellung einer M1-polarisierten KC nach Stimulation mit JWH-133.** Über die Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors folgt die Induktion der HO-1. Der LPS-getriggerte TLR4-Signalweg mit Aktivierung von NFκB und Stimulation der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF-α wird durch die Aktivierung der HO-1 gehemmt. Die Folge ist eine verminderte Produktion inflammatorischer Substanzen.

Noch nicht genau geklärt ist, über welche Zwischenschritte die HO-1 über eine Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors induziert wird. Ein möglicher Mechanismus könnte die CB<sub>2</sub>-Rezeptor-getriggerte Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-gamma (PPAR-γ) mit anschließender Aktivierung von HO-1 sein.

In mehreren Studien wurde bereits beschrieben, dass Cannabinoide und die Aktivierung von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren eine Induktion von PPAR-γ zur Folge hat (O'Sullivan 2007; O'Sullivan, Kendall et al. 2009; O'Sullivan and Kendall 2010). Zusätzlich wurde bereits aufgezeigt, dass PPAR-γ und HO-1 sich gegenseitig stimulieren und beide anti-inflammatorische Wirkungen erzielen (Kronke, Kadl et al.

2007; Yang, Zhao et al. 2012). PPAR- $\gamma$  ist an der Konversion zu M2-polarisierten Makrophagen beteiligt (Hasegawa-Moriyama, Kurimoto et al. 2013). Es fehlen jedoch Versuche, die diese Einzelerkenntnisse der oben genannten Arbeitsgruppen zusammenfügen.



**Abb.35) schematische Darstellung des potentiellen CB2 - PPAR- $\gamma$  - HO-1 Signalweges.**  
*Detaillierte Beschreibung siehe Text.*

Ergebnisse dieser Arbeit und der Arbeitsgruppe von Louvet et al. haben gezeigt, dass durch die Stimulation mit selektiven CB<sub>2</sub>-Agonisten die Synthese von HO-1 signifikant gesteigert werden kann.

#### 6.4 Einfluss der HO-1 auf die portale Hypertension und auf die isolierte KC

Die Grundzüge der protektiven Wirkung der HO-1 sind bereits erforscht. Die Arbeitsgruppe Yang et al. (Yang, Zhao et al. 2012) untersuchte die Wirkung von HO-1 auf die Fibrogenese am Modell der CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberzirrhose der Ratte. Die Aktivierung der HO-1 mittels Hemin reduzierte die Fibrosebildung signifikant über eine reduzierte Kollagenbildung und eine Inhibition der proliferierenden HSC. Die HO-1 hemmt die NF- $\kappa$ B Aktivierung über die Induktion von PPAR- $\gamma$  (Yang, Zhao et al.

2012). Die Folge ist eine reduzierte Sekretion von inflammatorischen Mediatoren wie vor allem TNF- $\alpha$ .

Die Aktivierung der HO-1 hat auch protektive Wirkungen auf die portale Hypertension: Unsere Ergebnisse der isoliert perfundierten Leber am Modell BDL zeigte nach Inhibition von HO-1 mittels ZnPP IX eine signifikante Zunahme des Pfortaderdrucks (Abb.27). Des Weiteren ergaben Analysen der Leberlysate zirrhotischer Tiere eine gesteigerte Bildung von TXB<sub>2</sub> (Abb.29). Die Hemmung der HO-1 ab der 30. Minute und die KC Stimulation ab der 40. Minute induzierte im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ZnPP IX eine knapp 3-fache Steigerung der TXB<sub>2</sub>-Sekretion ab der 44 Minute. Im weiteren Verlauf reduzierte sich die Ausschüttung von TXB<sub>2</sub>, jedoch waren alle gemessenen Werte bis zum Ende der Perfusion signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

Die *in situ* Ergebnisse konnten am Modell TAA von der Arbeitsgruppe Van Landeghem et al. (Van Landeghem, Laleman et al. 2009) und an gesunden Tieren von unserer Arbeitsgruppe Steib et al. (Steib, Gmelin et al. 2013) bestätigt werden. Die Hemmung der HO-1 an der isolierten Perfusion der gesunden Rattenleber im Vergleich zur Kontrollgruppe führte zu einem Anstieg des portalen Perfusionsdrucks. Des Weiteren wurden in der Arbeitsgruppe Steib et al. nicht nur die Sekretion von TXB<sub>2</sub> gemessen, sondern auch von Prostaglandin D<sub>2</sub> und Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (Steib, Gmelin et al. 2013). Interessanterweise wurden diese Mediatoren durch die Hemmung von HO-1 gesteigert sezerniert. Die HO-1 muss demnach hemmende Wirkung auf die Ausschüttung von vasokonstringierenden Mediatoren haben.

Die Arbeitsgruppe Van Landegham et al. aktivierte die HO-1 mittels Hemin 18 Stunden vor Versuchsbeginn. Über die Hemin-getriggerte Steigerung der HO-1 Aktivität konnte eine Reduktion des portalen Perfusionsdruck in der zirrhotischen Ratte erzielt werden. Die Reduktion des Perfusionsdrucks wurde in dieser Studie auf die gesteigerte CO Bildung zurückgeführt. Es gibt jedoch bereits Studien, die gezeigt haben, dass die Hemin-getriggerte Steigerung der HO-1 Expression hemmende Wirkung auf die NF $\kappa$ B Aktivierung hat (Yang, Zhao et al. 2012). Des Weiteren ist bekannt, dass eine gesteigerte Aktivität der HO-1 mit einer Reduktion der COX Aktivität einhergeht (Haider, Olszanecki et al. 2002). Die Hemmung von NF $\kappa$ B und die verminderte Aktivität von COX könnte die reduzierte Synthese von TXB<sub>2</sub> erklären. Anscheinend hat die HO-1 nicht nur durch die Bildung von CO relaxierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur (Suematsu and Ishimura 2000; Van Landeghem,

Laleman et al. 2009) sondern auch durch ihre inhibierende Wirkung auf die Synthese vasokonstringierender Substanzen.

Allerdings sind die genauen Signalwege noch nicht bekannt. Es sind weitere Untersuchungen an Tiermodellen nötig, um die genauen Mechanismen der HO-1 und ihre Interaktion mit anderen anti-inflammatorischen Mediatoren zu verstehen.

## **6.5 CB<sub>2</sub>-Agonisten als potentielle Therapieoption bei Leberzirrhose und portaler Hypertension**

Lange Zeit wurde dem spezifischen CB<sub>1</sub>-Rezeptor Antagonisten großes Potential in der Behandlung der Adipositas und der Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren unterstellt. Im Jahre 2006 erfolgte die erste Zulassung des ersten spezifischen CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten, Rimonabant. Man glaubte, dass diese Wirkungen auch auf Lebererkrankungen übertragen werden könnten. Tatsächlich konnte dies in der Phase-III-Studie an übergewichtigen Patienten gezeigt werden. Rimonabant induzierte eine Minderung der Serum-Transaminasen-Konzentration (Van Gaal, Scheen et al. 2008) und eine Reduktion des Fettgehalts der Leber (Despres, Golay et al. 2005).

Jedoch ergaben erste Langzeitstudien mit Rimonabant starke psychische Nebenwirkungen wie Angstzustände, Depressionen und Übelkeit (Despres, Golay et al. 2005). Im Jahr 2008 verlor Rimonabant aufgrund seiner psychischen Nebenwirkungen seine Zulassung in Europa (Le Foll, Gorelick et al. 2009).

Dennoch wird aufgrund der bedeutsamen Ergebnisse an der Entwicklung eines zweiten ausschließlich peripher wirkenden CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten geforscht, um die Wirksamkeit in der Behandlung von Lebererkrankungen weiter untersuchen zu können.

Im Vergleich zu Rimonabant scheinen spezifische CB<sub>2</sub>-Agonisten keine psychischen Symptome zu provozieren. Diese Aussage stimmt mit der Tatsache überein, dass CB<sub>2</sub>-Rezeptoren hauptsächlich in der Peripherie exprimiert werden und in erster Linie auf Immunzellen lokalisiert sind (Beltramo, Bernardini et al. 2006; Guindon and Hohmann 2008).

In den letzten Jahren konnte das große therapeutische Potential der spezifischen CB<sub>2</sub>-Agonisten im Management der chronischen Lebererkrankungen bewiesen

werden (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013). Viele der Studien befassen sich mit den protektiven Effekten der CB<sub>2</sub>-Agonisten in Bezug auf die Fibrogenese (Julien, Grenard et al. 2005), den Ischämie/Reperfusionsschaden (Batkai, Osei-Hyiaman et al. 2007) und die Leberregeneration (Teixeira-Clerc, Belot et al. 2010) an der zirrhotischen Leber an den Modellen BDL, TAA und CCl<sub>4</sub>. Nur sehr wenige Studien untersuchten die Wirkungsweise der CB<sub>2</sub>-Agonisten auf die portale Hypertension.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Arbeitsgruppen wie Louvet et al. 2011 (Louvet, Teixeira-Clerc et al. 2011), Lin et al. 2011 (Lin, Yang et al. 2011) und Horvath et al. 2012 (Horvath, Magid et al. 2012) weisen hin auf das große therapeutische Potential der CB<sub>2</sub>-Agonisten in der Behandlung der portalen Hypertension.

Jedoch sind die exakten Mechanismen der CB<sub>2</sub>-Agonisten in diesem Zusammenhang weitestgehend unbekannt. Zu klären bleibt, welche weiteren Moleküle an diesem Signalweg beteiligt sind und ob die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Zirrhosemodellen übereinstimmen.

Zusätzlich muss ermittelt werden, ob CB<sub>2</sub>-Agonisten im menschlichen Organismus die gleichen Effekte erzielen, wie sie an den Tiermodellen gezeigt wurden, und welche Nebenwirkungen durch die Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Agonisten am Menschen verursacht werden.

Fraglich ist auch, ob CB<sub>2</sub>-Agonisten gleiche Wirkungen in den unterschiedlichen Ätiologien der Leberzirrhose erzielen können. Es wurden den CB<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten schwerwiegende steatogene Eigenschaften in den frühen Stadien der nicht alkoholisch-induzierten Fettleber Erkrankung (NAFLD) nachgewiesen. Jedoch konnte auch an verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass CB<sub>2</sub>-Agonisten aufgrund ihrer anti-inflammatorischen und ihrer anti-fibrotischen Effekte starke protektive Wirkungen bei nicht alkoholisch-induzierter Steatohepatitis (NASH) haben (Mallat, Teixeira-Clerc et al. 2013).

Des Weiteren ist noch zu klären, ab welchem Krankheitsstadium der CB<sub>2</sub>-Agonist verabreicht werden soll. Aufgrund seiner anti-fibrogenetischen Wirkung könnte man gegebenenfalls durch die prophylaktische Gabe die Entstehung einer Leberfibrose oder sogar Leberzirrhose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C oder chronischer äthyltoxischer Leberschädigung verhindern.

Um die hepatoprotektiven Wirkungen sicher verifizieren zu können, bedarf es Langzeitstudien, die diese oben genannten Annahmen bestätigen.

Viele Fragen sind noch zu klären bevor CB<sub>2</sub>-Agonisten am Menschen eingesetzt werden können. Bislang sind sie jedoch Hoffnungsträger für die Behandlung der Leberzirrhose und der portalen Hypertension.



## 7. Zusammenfassung

Die portale Hypertension und ihre Folgen sind schwerwiegende Komplikationen der Leberzirrhose. Großen Einfluss auf entzündliche Prozesse in der geschädigten Leber haben die Kupfferzellen. Durch deren Aktivierung werden inflammatorische Mediatoren synthetisiert, welche an der Entstehung und Aufrechterhaltung der portalen Hypertension beteiligt sind.

Das Ziel derzeitiger Studien ist, ein besseres Verständnis der Pathophysiologie der Leberzirrhose und der portalen Hypertension zu erhalten, sowie spezifische Medikamente zu entwickeln, welche gezielt in dieses System eingreifen.

In diesem Rahmen wurde den Cannabinoiden und Cannabinoidrezeptoren besondere Bedeutung zugemessen.

Interessanterweise sind sie vor allem auf Immunzellen wie den Kupfferzellen lokalisiert.

Die Aktivierung des CB<sub>2</sub>-Rezeptors scheint eine anti-inflammatorische Wirkung zu besitzen. Zu den Eigenschaften gehören: die Reduktion der Fibrogenese und die Verhinderung des Einwanderns von Entzündungszellen nach Ischämie und Reperfusion.

1.) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CB<sub>2</sub>-Agonisten in der chronisch geschädigten Rattenleber den portalen Druck senken. Nicht nur der basale portale Druck, sondern auch der maximale portale Druck nach Induktion einer Endotoxämie im prähepatischen Gefäßbett konnten durch die Vorbehandlung mittels JWH-133, einem CB<sub>2</sub>-Agonisten, gesenkt werden.

Verantwortlich für diese Druckreduktion ist wahrscheinlich die Induktion der HO-1 mit ihrer hemmenden Wirkung auf die Thromboxan A<sub>2</sub>-Sekretion in den Kupfferzellen nach Behandlung mit dem CB<sub>2</sub>-Agonisten JWH-133.

Interessanterweise veränderte sich der systemische Blutdruck im Vergleich zur Kontrollgruppe in den *in vivo* Versuchen nicht.

2.) Um dieses Phänomen besser zu verstehen, untersuchten wir nicht nur die Wirkung der CB<sub>2</sub>-Agonisten am *in vivo* und am *in situ* Modell, sondern führten auch Untersuchungen an isolierten Kupfferzellen durch.

Die Ergebnisse an den *in vivo* und *in situ* Modellen wurden durch die Zellisolationen bestätigt. Auch hier wurde durch die Vorbehandlung mit JWH-133 eine verminderte Thromboxan Sekretion gemessen.

3.) Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus von CB<sub>2</sub>-Agonisten ist die Induktion der HO-1. Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass durch die Stimulation der KC mittels Zymosan und vorheriger Behandlung mit JWH-133 eine verstärkte Expression der HO-1 erzielt wurde. Welche weiteren Moleküle an diesem Signalweg beteiligt sind bleibt jedoch ungeklärt.

Bekannt ist, dass die HO-1 protektive Wirkungen besitzt. Dies bestätigten auch unsere Ergebnisse. Am *in situ* konnte veranschaulicht werden, dass durch die Hemmung der HO-1 sowohl der portale Perfusionsdruck signifikant gesteigert wurde als auch der Thromboxan B<sub>2</sub>-Efflux signifikant erhöht war.

4.) Zum ersten Mal wurde durch die vorliegenden Experimente gezeigt, dass sich die Expression von CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und der HO-1 durch die Stimulation von Zymosan oder LPS induzieren lässt. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass auch die Vorbehandlung mit JWH-133 eine Induktion der CB<sub>2</sub>-Rezeptoren und der HO-1 zur Folge hat. Die Ko-Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen und JWH-133 bewirkte allerdings keine weitere Steigerung der Expression.

Anhand der von uns vorgestellten Untersuchungen wurde somit erstmals gezeigt, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen CB<sub>2</sub>-Agonisten und der Induktion der HO-1 gibt.

Die Behandlung mit CB<sub>2</sub>-Agonisten scheint eine vielversprechende, potente Möglichkeit zu sein, um zukünftig die portale Hypertension bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen zu behandeln.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

5-LOX	5-Lipoxygenase
AA	Arachidonsäure
AEA	Anandamide
ADH	Anti-Diuretisches Hormon
AFP	Alpha Feto Protein
AT-1	Angiotensin 1 Rezeptor
BDL	Bile Duct Ligaton = Gallengangligatur
CaNa <sub>2</sub> EDTA	Calcium-dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
C3a	aktivierter Komplement Faktor 3
C5a	aktivierter Komplement Faktor 5
CB <sub>1</sub>	Cannabinoid Rezeptor 1
CB <sub>2</sub>	Cannabinoid Rezeptor 2
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
DNase	Deoxyribonuklease
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EvG	Elastica van Gieson
EVL	endoskopisch gesteuerte Varizenligatur = endoscopic variceal ligation
FAAH	Fettsäureamid Hydrolase
GBSS	Grey's Balance Salt Solution
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
KC	Kupfferzelle
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCL	Chlorwasserstoff
HCV	Hepatitis C Virus
HE	Hämatoxylin und Eosin Färbung

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO	Hämoxygenase
HPS	Hepatopulmonales Syndrom
HRS	Hepatorenales Syndrom
HSC	Hepatische Sternzelle
HVPG	hepatischer venöser Druckgradient
IFN-γ	Interferon-gamma
IHVR	intrahepatischer Gefäßwiderstand
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISMN	Isosorbit-5 Mononitrat
JWH-133	CB <sub>2</sub> Rezeptor Agonist
KCl	Kaliumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
M1	Makrophage -1 Differenzierung
M2	Makrophage -2Differenzierung
MELD	Model of End-Stage Liver Disease
MMP-2	Matrixmetalloproteinase-2
NaCl	Natriumchlorid
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NFκB	Nuklearer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NSBB	nicht selektive Beta-Blocker
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid Anion
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
PBS	Phosphat Buffer Solution
PG	Prostaglandin
PGH2	Prostaglandin H2
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 = Zellmedium
SD	Sprague Dawley
SBP	Spontan bakterielle Peritonitis

SEC	sinusoidale Endothelzellen
TAA	Thioacetamid
THC	Tetrahydrocannabinol
TIPS	transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
TPR	Totaler Peripherer Widerstand
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZnPP IX	Zinc protoporphyrin IX = Hemmstoff der Hämoxygenase 1

## 9. Literaturverzeichnis

- Alabraba, E. B., S. M. Curbishley, et al. (2007). "A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells." J Immunol Methods **326**(1-2): 139-144.
- Angeli, P., F. Wong, et al. (2006). "Hyponatremia in cirrhosis: Results of a patient population survey." Hepatology **44**(6): 1535-1542.
- Arroyo, V., P. Gines, et al. (1996). "Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. International Ascites Club." Hepatology **23**(1): 164-176.
- Bahr, M. J. and M. P. Manns (1999). "[Liver cirrhosis]. Leberzirrhose." Internist (Berl) **40**(12): 1308-1322.
- Banares, R., A. Albillos, et al. (2002). "Endoscopic treatment versus endoscopic plus pharmacologic treatment for acute variceal bleeding: a meta-analysis." Hepatology **35**(3): 609-615.
- Bari, K. and G. Garcia-Tsao (2012). "Treatment of portal hypertension." World journal of gastroenterology : WJG **18**(11): 1166-1175.
- Batkai, S., Z. Jarat, et al. (2001). "Endocannabinoids acting at vascular CB<sub>1</sub> receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis." Nat Med **7**(7): 827-832.
- Batkai, S., D. Osei-Hyiaman, et al. (2007). "Cannabinoid-2 receptor mediates protection against hepatic ischemia/reperfusion injury." FASEB J **21**(8): 1788-1800.
- Batkai, S., P. Pacher, et al. (2004). "Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension." Circulation **110**(14): 1996-2002.

- Bauer, I., G. A. Wanner, et al. (1998). "Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver." Hepatology **27**(3): 829-838.
- Beltramo, M., N. Bernardini, et al. (2006). "CB2 receptor-mediated antihyperalgesia: possible direct involvement of neural mechanisms." Eur J Neurosci **23**(6): 1530-1538.
- Bernard, B., J. D. Grange, et al. (1999). "Antibiotic prophylaxis for the prevention of bacterial infections in cirrhotic patients with gastrointestinal bleeding: a meta-analysis." Hepatology (Baltimore, Md) **29**(6): 1655-1661.
- Biggins, S. W., W. R. Kim, et al. (2006). "Evidence-based incorporation of serum sodium concentration into MELD." Gastroenterology **130**(6): 1652-1660.
- Bilzer, M., H. Jaeschke, et al. (1999). "Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): G1137-1144.
- Bilzer, M. and B. H. Lauterburg (1993). "Peptidoleukotrienes increase the efflux of glutathione from perfused rat liver." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **49**(3): 715-721.
- Bilzer, M., F. Roggel, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease." Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver **26**(10): 1175-1186.
- Bosch, J., J. G. Abraldes, et al. (2010). "Hepatic endothelial dysfunction and abnormal angiogenesis: new targets in the treatment of portal hypertension." J Hepatol **53**(3): 558-567.
- Bosch, J. and J. C. Garcia-Pagan (2003). "Prevention of variceal rebleeding." Lancet **361**(9361): 952-954.

- Brocchi E, C. G., Brambilla G, Mantia LL, Lupinacci G, Pisano G, Puerari G, Zambelli A, Barbagli S, Ciani P, Manneschi L, Brunati S, Curioni R, Agape D, Antoniozzi F, Arcidiacono P, Ballarin E, Basilico M, Bocchia P, Bonato C, Cipolla M, Colombo A, (1988). "Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. A prospective multicenter study." N Engl J Med **319**(15): 983-989.
- Buckley, N. E., S. Hansson, et al. (1998). "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat." Neuroscience **82**(4): 1131-1149.
- Carvajal, J. A., A. M. Germain, et al. (2000). "Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation." Journal of cellular physiology **184**(3): 409-420.
- Correa, F., M. Hernangomez, et al. (2010). "Anandamide enhances IL-10 production in activated microglia by targeting CB(2) receptors: roles of ERK1/2, JNK, and NF-kappaB." Glia **58**(2): 135-147.
- D'Amico, G., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2006). "Hepatic vein pressure gradient reduction and prevention of variceal bleeding in cirrhosis: a systematic review." Gastroenterology **131**(5): 1611-1624.
- D'Amico, G., L. Pagliaro, et al. (2010). "Emergency sclerotherapy versus vasoactive drugs for bleeding oesophageal varices in cirrhotic patients." Cochrane Database Syst Rev(3): CD002233.
- D'Amico, G., G. Pietrosi, et al. (2003). "Emergency sclerotherapy versus vasoactive drugs for variceal bleeding in cirrhosis: a Cochrane meta-analysis." Gastroenterology **124**(5): 1277-1291.



- de Franchis, R., V. F. Baveno, et al. (2010). "Revising consensus in portal hypertension: report of the Baveno V consensus workshop on methodology of diagnosis and therapy in portal hypertension." Journal of hepatology **53**(4): 762-768.
- Decker, K. (1990). "Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)." European journal of biochemistry / FEBS **192**(2): 245-261.
- Despres, J. P., A. Golay, et al. (2005). "Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia." N Engl J Med **353**(20): 2121-2134.
- Di Marzo, V. (2008). "Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?" Nat Rev Drug Discov **7**(5): 438-455.
- Dimitriadis, G., V. Papadopoulos, et al. (2011). "Eplerenone reverses spironolactone-induced painful gynaecomastia in cirrhotics." Hepatol Int **5**(2): 738-739.
- Dufour, J. F. and P.-A. Clavien (2010). Signaling pathways in liver diseases. Heidelberg ; New York, Springer.
- Edwards, J. P., X. Zhang, et al. (2006). "Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations." J Leukoc Biol **80**(6): 1298-1307.
- Enomoto, N., K. Ikejima, et al. (2001). "Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin." Alcoholism, clinical and experimental research **25**(6 Suppl): 51S-54S.
- Fernandez, J., L. Ruiz del Arbol, et al. (2006). "Norfloxacin vs ceftriaxone in the prophylaxis of infections in patients with advanced cirrhosis and hemorrhage." Gastroenterology **131**(4): 1049-1056; quiz 1285.

- Fernandez, M. and H. L. Bonkovsky (1999). "Increased heme oxygenase-1 gene expression in liver cells and splanchnic organs from portal hypertensive rats." Hepatology **29**(6): 1672-1679.
- Friedman, S. L. (2004). "Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications." Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol **1**(2): 98-105.
- Garcia-Pagan, J. C., K. Caca, et al. (2010). "Early use of TIPS in patients with cirrhosis and variceal bleeding." N Engl J Med **362**(25): 2370-2379.
- Garcia-Pagan, J. C., J. Gracia-Sancho, et al. (2012). "Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis." J Hepatol **57**(2): 458-461.
- Garcia-Tsao, G. (2001). "Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis." Gastroenterology **120**(3): 726-748.
- Garcia-Tsao, G. and J. Bosch (2010). "Management of varices and variceal hemorrhage in cirrhosis." N Engl J Med **362**(9): 823-832.
- Garcia-Tsao, G., A. J. Sanyal, et al. (2007). "Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis." Hepatology **46**(3): 922-938.
- Garcia-Tsao, G., A. J. Sanyal, et al. (2007). "Prevention and management of gastroesophageal varices and variceal hemorrhage in cirrhosis." Am J Gastroenterol **102**(9): 2086-2102.
- Gebremedhin, D., A. R. Lange, et al. (1999). "Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **276**(6): H2085-H2093.

- Gerbes, A. L. and V. Gulberg (2004). "Diagnosis and treatment of ascites." Deutsche Medizinische Wochenschrift **129**: S63-S65.
- Gerbes, A. L. and V. Gulberg (2006). "Progress in treatment of massive ascites and hepatorenal syndrome." World journal of gastroenterology : WJG **12**(4): 516-519.
- Gerbes, A. L., V. Gulberg, et al. (2011). "[German S 3-guideline "ascites, spontaneous bacterial peritonitis, hepatorenal syndrome"]." Zeitschrift fur Gastroenterologie **49**(6): 749-779.
- Gerbes, A. L., V. Gulberg, et al. (1998). "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) for variceal bleeding in portal hypertension: comparison of emergency and elective interventions." Dig Dis Sci **43**(11): 2463-2469.
- Gesundheitsbericht für Deutschland (1998). "Chronische Lebererkrankungen und -zirrhose , Kapitel 5.22".
- Gines, P., A. Cardenas, et al. (2004). "Management of cirrhosis and ascites." N Engl J Med **350**(16): 1646-1654.
- Gines, P., E. Quintero, et al. (1987). "Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors." Hepatology **7**(1): 122-128.
- Gines, P., L. Tito, et al. (1988). "Randomized comparative study of therapeutic paracentesis with and without intravenous albumin in cirrhosis." Gastroenterology **94**(6): 1493-1502.
- Gluud, L. L., S. Klingenberg, et al. (2007). "Banding ligation versus beta-blockers as primary prophylaxis in esophageal varices: systematic review of randomized trials." Am J Gastroenterol **102**(12): 2842-2848; quiz 2841, 2849.

- Gluud, L. L., E. Langholz, et al. (2010). "Meta-analysis: isosorbide-mononitrate alone or with either beta-blockers or endoscopic therapy for the management of oesophageal varices." Alimentary pharmacology & therapeutics **32**(7): 859-871.
- Goulis, J., D. Patch, et al. (1999). "Bacterial infection in the pathogenesis of variceal bleeding." Lancet **353**(9147): 139-142.
- Graham, D. Y. and J. L. Smith (1981). "The course of patients after variceal hemorrhage." Gastroenterology **80**(4): 800-809.
- Graupera, M., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2003). "Cyclooxygenase-derived products modulate the increased intrahepatic resistance of cirrhotic rat livers." Hepatology **37**(1): 172-181.
- Graupera, M., J. C. Garcia-Pagan, et al. (2002). "5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes." Gastroenterology **122**(2): 387-393.
- Groszmann, R. J., G. Garcia-Tsao, et al. (2005). "Beta-blockers to prevent gastroesophageal varices in patients with cirrhosis." N Engl J Med **353**(21): 2254-2261.
- Guindon, J. and A. G. Hohmann (2008). "Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain." Br J Pharmacol **153**(2): 319-334.
- Gulberg, V. and A. L. Gerbes (2003). "Pharmacological treatment of ascites and hepatorenal syndrome." Deutsche Medizinische Wochenschrift **128**(8): 375-377.
- Gulberg, V., I. Liss, et al. (2002). "Improved quality of life in patients with refractory or recidivant ascites after insertion of transjugular intrahepatic portosystemic shunts." Digestion **66**(2): 127-130.

- Haider, A., R. Olszanecki, et al. (2002). "Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells." J Pharmacol Exp Ther **300**(1): 188-194.
- Hasegawa-Moriyama, M., T. Kurimoto, et al. (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone attenuates inflammatory pain through the induction of heme oxygenase-1 in macrophages." Pain.
- Heidelbaugh, J. J., M. Bruderly. (2006). "Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation." American family physician **74**(5).
- Heintges, T., J. R. Wands, et al. (1997). "Hepatitis C virus: epidemiology and transmission." Hepatology **26**(3): 521-526.
- Hennenberg, M., E. Biecker, et al. (2006). "Defective RhoA/Rho-kinase signaling contributes to vascular hypocontractility and vasodilation in cirrhotic rats." Gastroenterology **130**(3): 838-854.
- Hennenberg, M., J. Trebicka, et al. (2008). "Mechanisms of extrahepatic vasodilation in portal hypertension." Gut **57**(9): 1300-1314.
- Horvath, B., L. Magid, et al. (2012). "A new cannabinoid CB2 receptor agonist HU-910 attenuates oxidative stress, inflammation and cell death associated with hepatic ischaemia/reperfusion injury." Br J Pharmacol **165**(8): 2462-2478.
- Huang, H. C., S. S. Wang, et al. (2012). "Cannabinoid receptor 2 agonist ameliorates mesenteric angiogenesis and portosystemic collaterals in cirrhotic rats." Hepatology **56**(1): 248-258.
- Huang, L., M. A. Quinn, et al. (2011). "Recent advances in the understanding of the role of the endocannabinoid system in liver diseases." Dig Liver Dis **43**(3): 188-193.

- Iwakiri, Y. (2012). "Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension." Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver **32**(2): 199-213.
- Iwakiri, Y. and R. J. Groszmann (2007). "Vascular endothelial dysfunction in cirrhosis." J Hepatol **46**(5): 927-934.
- Julien, B., P. Grenard, et al. (2005). "Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver." Gastroenterology **128**(3): 742-755.
- Kawada, N., H. Klein, et al. (1992). "Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells." Biochem J **285 ( Pt 2)**: 367-371.
- Kawada, N., T. A. Tran-Thi, et al. (1993). "The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus." European journal of biochemistry / FEBS **213**(2): 815-823.
- Kim, D. H. and J. Y. Park (2013). "Prevention and management of variceal hemorrhage." Int J Hepatol **2013**: 434609.
- Kolios, G., V. Valatas, et al. (2006). "Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease." World journal of gastroenterology : WJG **12**(46): 7413-7420.
- Kronke, G., A. Kadl, et al. (2007). "Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **27**(6): 1276-1282.
- Laleman, W., L. Landeghem, et al. (2005). "Portal hypertension: from pathophysiology to clinical practice." Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver **25**(6): 1079-1090.

- Laleman, W., I. Vander Elst, et al. (2006). "A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited." Eur J Clin Invest **36**(4): 242-249.
- Lavanchy, D. (2009). "The global burden of hepatitis C." Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver **29 Suppl 1**: 74-81.
- Le Foll, B., D. A. Gorelick, et al. (2009). "The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists." Psychopharmacology (Berl) **205**(1): 171-174.
- Lee, I. T., S. F. Luo, et al. (2009). "Overexpression of HO-1 protects against TNF-alpha-mediated airway inflammation by down-regulation of TNFR1-dependent oxidative stress." Am J Pathol **175**(2): 519-532.
- Lin, H. C., Y. Y. Yang, et al. (2011). "The relationship between endotoxemia and hepatic endocannabinoids in cirrhotic rats with portal hypertension." Journal of Hepatology **54**(6): 1145-1153.
- Louvet, A., F. Teixeira-Clerc, et al. (2011). "Cannabinoid CB2 receptors protect against alcoholic liver disease by regulating Kupffer cell polarization in mice." Hepatology **54**(4): 1217-1226.
- Luca, A., G. D'Amico, et al. (1999). "TIPS for prevention of recurrent bleeding in patients with cirrhosis: meta-analysis of randomized clinical trials." Radiology **212**(2): 411-421.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." FASEB J **2**(10): 2557-2568.
- Makino, N., M. Suematsu, et al. (2001). "Altered expression of heme oxygenase-1 in the livers of patients with portal hypertensive diseases." Hepatology **33**(1): 32-42.

- Mallat, A. and S. Lotersztajn (2008). "Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **294**(1): G9-G12.
- Mallat, A., F. Teixeira-Clerc, et al. (2011). "The endocannabinoid system as a key mediator during liver diseases: new insights and therapeutic openings." Br J Pharmacol **163**(7): 1432-1440.
- Mallat, A., F. Teixeira-Clerc, et al. (2013). "Cannabinoid signaling and liver therapeutics." J Hepatol.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Matsuda, L. A., S. J. Lolait, et al. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." Nature **346**(6284): 561-564.
- Merkel, C., R. Marin, et al. (2004). "A placebo-controlled clinical trial of nadolol in the prophylaxis of growth of small esophageal varices in cirrhosis." Gastroenterology **127**(2): 476-484.
- Mohd Hanafiah, K., J. Groeger, et al. (2013). "Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence." Hepatology **57**(4): 1333-1342.
- Moore, K. P., F. Wong, et al. (2003). "The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club." Hepatology (Baltimore, Md) **38**(1): 258-266.
- Moore, K. P., F. Wong, et al. (2003). "The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club." Hepatology **38**(1): 258-266.



- Moreira, R. K. (2007). "Hepatic stellate cells and liver fibrosis." Archives of Pathology & Laboratory Medicine **131**(11): 1728-1734.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.
- Munoz, J., A. Albillos, et al. (1999). "Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor-alpha in portal hypertensive rats." Am J Physiol **276**(3 Pt 1): G687-693.
- Munoz-Luque, J., J. Ros, et al. (2008). "Regression of fibrosis after chronic stimulation of cannabinoid CB2 receptor in cirrhotic rats." J Pharmacol Exp Ther **324**(2): 475-483.
- Naito, M., G. Hasegawa, et al. (2004). "Differentiation and function of Kupffer cells." Med Electron Microsc **37**(1): 16-28.
- O'Sullivan, S. E. (2007). "Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors." Br J Pharmacol **152**(5): 576-582.
- O'Sullivan, S. E. and D. A. Kendall (2010). "Cannabinoid activation of peroxisome proliferator-activated receptors: potential for modulation of inflammatory disease." Immunobiology **215**(8): 611-616.
- O'Sullivan, S. E., D. A. Kendall, et al. (2009). "Time-dependent vascular effects of Endocannabinoids mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)." PPAR Res **2009**: 425289.
- Pacher, P., S. Batkai, et al. (2006). "The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy." Pharmacological Reviews **58**(3): 389-462.

- Philippidis, P., J. C. Mason, et al. (2004). "Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery." Circ Res **94**(1): 119-126.
- Pockros, P. J. and T. B. Reynolds (1986). "Rapid diuresis in patients with ascites from chronic liver disease: the importance of peripheral edema." Gastroenterology **90**(6): 1827-1833.
- Potenza, M. A., O. A. Botrugno, et al. (2002). "Endothelial COX-1 and -2 differentially affect reactivity of MVB in portal hypertensive rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(3): G587-594.
- Rajesh, M., H. Pan, et al. (2007). "Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis." J Leukoc Biol **82**(6): 1382-1389.
- Ramachandran, A. and K. A. Balasubramanian (2001). "Intestinal dysfunction in liver cirrhosis: Its role in spontaneous bacterial peritonitis." J Gastroenterol Hepatol **16**(6): 607-612.
- Reynaert, H., M. G. Thompson, et al. (2002). "Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension." Gut **50**(4): 571-581.
- Reynolds, T. B., F. L. Lieberman, et al. (1978). "Advantages of treatment of ascites without sodium restriction and without complete removal of excess fluid." Gut **19**(6): 549-553.
- Rockey, D. C. (2003). "Vascular mediators in the injured liver." Hepatology (Baltimore, Md) **37**(1): 4-12.

- Ros, J., J. Claria, et al. (2002). "Endogenous cannabinoids: A new system involved in the homeostasis of arterial pressure in experimental cirrhosis in the rat." Gastroenterology **122**(1): 85-93.
- Rosen, H. R. (2011). "Clinical practice. Chronic hepatitis C infection." N Engl J Med **364**(25): 2429-2438.
- Rossle, M. and A. L. Gerbes (2010). "TIPS for the treatment of refractory ascites, hepatorenal syndrome and hepatic hydrothorax: a critical update." Gut **59**(7): 988-1000.
- Rossle, M., A. Ochs, et al. (2000). "A comparison of paracentesis and transjugular intrahepatic portosystemic shunting in patients with ascites." N Engl J Med **342**(23): 1701-1707.
- Runyon, B. A. (2013). "Introduction to the revised American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guideline management of adult patients with ascites due to cirrhosis 2012." Hepatology **57**(4): 1651-1653.
- Salerno, F., C. Camma, et al. (2007). "Transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory ascites: a meta-analysis of individual patient data." Gastroenterology **133**(3): 825-834.
- Samuelsson, B., S. E. Dahlen, et al. (1987). "Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects." Science **237**(4819): 1171-1176.
- Santos, J., R. Planas, et al. (2003). "Spironolactone alone or in combination with furosemide in the treatment of moderate ascites in nonazotemic cirrhosis. A randomized comparative study of efficacy and safety." J Hepatol **39**(2): 187-192.
- Sarin, S. K., M. Wadhawan, et al. (2005). "Endoscopic variceal ligation plus propranolol versus endoscopic variceal ligation alone in primary prophylaxis of variceal bleeding." Am J Gastroenterol **100**(4): 797-804.

- Siegmund, S. V. (2010). "Role of the endocannabinoid system in alcoholic liver disease." Dig Dis **28**(6): 751-755.
- Sierra-Filardi, E., M. A. Vega, et al. (2010). "Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release." Immunobiology **215**(9-10): 788-795.
- Smith, J. L. and D. Y. Graham (1982). "Variceal hemorrhage: a critical evaluation of survival analysis." Gastroenterology **82**(5 Pt 1): 968-973.
- Steib, C. J. (2011). "Kupffer cell activation and portal hypertension." Gut **60**(10): 1307-1308.
- Steib, C. J., M. Bilzer, et al. (2010). "Kupffer cell activation by hydrogen peroxide: a new mechanism of portal pressure increase." Shock **33**(4): 412-418.
- Steib, C. J., A. L. Gerbes, et al. (2007). "Kupffer cell activation in normal and fibrotic livers increases portal pressure via thromboxane A(2)." J Hepatol **47**(2): 228-238.
- Steib, C. J., L. Gmelin, et al. (2013). "Portal pressure regulation following Kupffer cell activation: control of prostaglandin production by heme oxygenases." Digestion **87**(2): 102-109.
- Su, G. L. (2002). "Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(2): G256-265.
- Suematsu, M. and Y. Ishimura (2000). "The heme oxygenase-carbon monoxide system: a regulator of hepatobiliary function." Hepatology **31**(1): 3-6.
- Tam, J., J. Liu, et al. (2011). "Endocannabinoids in liver disease." Hepatology **53**(1): 346-355.

- Teixeira-Clerc, F., M. P. Belot, et al. (2010). "Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration." Hepatology **52**(3): 1046-1059.
- Teixeira-Clerc, F., B. Julien, et al. (2006). "CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis." Nat Med **12**(6): 671-676.
- Thein, H. H., Q. Yi, et al. (2008). "Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression." Hepatology **48**(2): 418-431.
- Titos, E., J. Claria, et al. (2000). "Hepatocyte-derived cysteinyl leukotrienes modulate vascular tone in experimental cirrhosis." Gastroenterology **119**(3): 794-805.
- Tripathi, D., J. W. Ferguson, et al. (2009). "Randomized controlled trial of carvedilol versus variceal band ligation for the prevention of the first variceal bleed." Hepatology **50**(3): 825-833.
- Ueno, N., M. Murakami, et al. (2001). "Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A(2)." Journal of Biological Chemistry **276**(37): 34918-34927.
- Van de Casteele, M., M. Hosli, et al. (1999). "Intraportal administration of glyceryl trinitrate or nitroprusside exerts more systemic than intrahepatic effects in anaesthetised cirrhotic rats." J Hepatol **31**(2): 300-305.
- Van Gaal, L. F., A. J. Scheen, et al. (2008). "Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study." Eur Heart J **29**(14): 1761-1771.
- Van Landeghem, L., W. Laleman, et al. (2009). "Carbon monoxide produced by intrasinusoidally located haem-oxygenase-1 regulates the vascular tone in cirrhotic rat liver." Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver **29**(5): 650-660.

- Veldt, B. J., F. Laine, et al. (2002). "Indication of liver transplantation in severe alcoholic liver cirrhosis: quantitative evaluation and optimal timing." J Hepatol **36**(1): 93-98.
- Verna, E. C. and R. S. Brown, Jr. (2006). "Hepatitis C virus and liver transplantation." Clin Liver Dis **10**(4): 919-940.
- Wang, R. and L. Wu (1997). "The chemical modification of KCa channels by carbon monoxide in vascular smooth muscle cells." Journal of Biological Chemistry **272**(13): 8222-8226.
- Wasley, A. and M. J. Alter (2000). "Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends." Semin Liver Dis **20**(1): 1-16.
- Wheeler, M. D. (2003). "Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease." Alcohol Res Health **27**(4): 300-306.
- Wiegand, J. and T. Berg (2013). "The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis." Dtsch Arztebl Int **110**(6): 85-91.
- Wiest, R. and R. J. Groszmann (2002). "The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough." Hepatology **35**(2): 478-491.
- Wiest, R., G. Lock, et al. (2000). "[Portal hypertension].  
Portale Hypertension." Internist (Berl) **41**(10): 1077-1095; quiz 1095.
- Wittenburg, H., U. Tennert, et al. (2011). "[Complications of liver cirrhosis].  
Komplikationen der Leberzirrhose." Internist (Berl) **52**(9): 1061-1070; quiz 1071-1062.
- Wong, F. (2012). "Management of ascites in cirrhosis." J Gastroenterol Hepatol **27**(1): 11-20.

- Wright, A. S. and L. F. Rikkers (2005). "Current management of portal hypertension." J Gastrointest Surg **9**(7): 992-1005.
- Wu, J. and P. A. Norton (1996). "Animal models of liver fibrosis." Scand J Gastroenterol **31**(12): 1137-1143.
- Xu, H., C. L. Cheng, et al. (2007). "Anti-inflammatory property of the cannabinoid receptor-2-selective agonist JWH-133 in a rodent model of autoimmune uveoretinitis." J Leukoc Biol **82**(3): 532-541.
- Xu, H., K. Korneszczyk, et al. (2005). "Thromboxane A2 from Kupffer cells contributes to the hyperresponsiveness of hepatic portal circulation to endothelin-1 in endotoxemic rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(2): G277-283.
- Yang, H., L. F. Zhao, et al. (2012). "Heme oxygenase-1 prevents liver fibrosis in rats by regulating the expression of PPARgamma and NF-kappaB." World journal of gastroenterology : WJG **18**(14): 1680-1688.
- Yang, Y. Y., H. C. Lin, et al. (2006). "Roles of anandamide in the hepatic microcirculation in cirrhotic rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(2): G328-334.
- Yokoyama, Y., H. Xu, et al. (2003). "Role of thromboxane A2 in early BDL-induced portal hypertension." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **284**(3): G453-460.
- Younossi ZM, Stepanova M, Afendy M, et al. (2011). "Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008." Clin Gastroenterol Hepatol **9**(6): 524-530.
- Zhang, X., W. P. Yu, et al. (2004). "Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells." World journal of gastroenterology : WJG **10**(4): 610-613.

## 10. Publierte Ergebnisse

Steib CJ., Gmelin L., Bilzer M., Göke B., Gerbes AL.: Portal Pressure Regulation following Kupffer Cell Activation: Control of Prostaglandin Production by Heme Oxygenases. *Digestion*. 2013 Jan;87(2):102-9.

Steib CJ.\*, Gmelin L.\*, S. Pfeiler, N. Leistner, J. Schewe, B. Göke, AL. Gerbes : Attenuation of portal pressure in rat liver cirrhosis: functional relevance of cannabinoid receptor 2 – heme oxygenase 1 pathway. *Life Sci*. 2013 Oct; 93(16):543-51.

op den Winkel M, Gmelin L., Schewe J., Leistner N., Bilzer M., Göke B., Gerbes AL. Steib CJ.: Role of Cysteinyl-leukotrienes for portal pressure regulation and liver damage in cholestatic rat livers. *Lab Invest*. 2013 Dec;93(12):1288-94.

## Kongressbeiträge

CJ. Steib, L. Gmelin, C. von Hesler, D. Mayr, E. De Toni, AL. Gerbes: Gabe von LPS in verschiedenen Stadien der Fibroseentwicklung: Rolle der Kupfferzellen. *Z Gastroenterol* 2011; 49 - P449.

CJ. Steib, M. op den Winkel, L. Gmelin, N. Leistner, C. von Hesler, I. Liß , AL. Gerbes: Aktivierung von Kupfferzellen: Rolle der Cysteinyl-Leukotriene bei der akuten cholestatischen Leberschädigung. *Z Gastroenterol* 2012; 50 - K038.

CJ. Steib, I. Reisinger, L. Gmelin, C. von Hesler, AL. Gerbes: Anstieg des portalen Druckes durch LPS: Wirkung von Rifaximin bei zirrhotischen Rattenlebern. *Z Gastroenterol* 2011; 49 - P396.



## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne deren tatkräftige Unterstützung und Hilfe diese Arbeit unmöglich gewesen wäre:

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Professor Dr. Alexander L. Gerbes* für die Überlassung des Themas sowie die freundliche und großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Außerdem gebührt ein herzlicher Dank meinem Betreuer *Dr. Christian J. Steib* für die Einarbeitung in das Thema der Lebererkrankungen sowie die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden. Viele Gespräche und Denkanstöße beeinflussten diese Arbeit ungemein. Bei der Umsetzung neuer Ideen und Anregungen war auf Ihn stets Verlass.

Frau *Susanne Pfeiler* vom Institut für Labormedizin der Universität München danke ich recht herzlich für die Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie.

Frau *Dr. Marie-Christin Makeschin* und Frau *Prof. Dr. Doris Mayr* vom Pathologischen Institut der LMU-München gilt mein großer Dank für die histologische Beurteilung der Gewebeproben.

Ein weiterer großer Dank gilt dem ganzen Laborteam vor allem hier zu nennen sind: *Christoph von Hesler* vielen Dank für die Hilfe bei den Tierversuchen.

Bei *Ingrid Liss*, möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der ELISA, für die große Hilfsbereitschaft bei labortechnischen Fragen und für die vielen schönen Gespräche in der Kaffeepause bedanken.

Ein weiterer Dank gilt *Antonia Rizzani* für die Hilfe und vielen Tipps bei den Versuchen in der Zellkultur.

Meiner Familie: Mein unendlicher Dank gilt vor allem meinem Vater, *Prof. Dr. Ekkehardt Gmelin*, ohne dich wäre ich niemals soweit gekommen. Das tiefe Vertrauen in mich, die vielen aufbauenden Gespräche, die ständige Unterstützung in

jeder Lebenssituation und die vielen unvergesslich schönen Momente haben mir große Kräfte verliehen.

Weiter großer Dank gilt meinem Bruder, *Alexander C. Gmelin*, und meinem Freund, Dr. *Carlo F. M. Jung*, die zu jeder Zeit für mich da waren und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand